

神経変性疾患病態における VGF nerve growth factor
inducible の役割と保護作用

野田 泰裕

目次

序論	1 頁
第 1 章 ハンチントン病モデルに対する VGF の作用	4 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 2 章 筋萎縮性側索硬化症モデルに対する VGF 由来ペプチドの作用	29 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 3 章 ヒト脊髄における VGF 産生細胞の解明及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	
病態における VGF 発現変化の検討	42 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
総括及び結論	59 頁
謝辞	62 頁
引用文献	63 頁
略語一覧表	72 頁

序論

神経変性疾患は、中枢神経の特定の神経細胞群が進行性に変性・脱落する疾患群であり、蛋白質の構造異常や凝集などを原因として特有の神経細胞を中心とした細胞変性及び脱落が進行性に起こることにより発症するとされている。病変部位により臨床・解剖学的に分類されており、大脳・基底核で起こるアルツハイマー病や前頭側頭葉変性症、パーキンソン病、ハンチントン病や小脳で起こる脊髄小脳変性症、多系統萎縮症、脊髄で起こる筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や脊髄性筋萎縮症など様々な疾患が存在する (1-6)。各疾患の真の発症メカニズムについては、いまだ不明な点が多く存在する。近年の分子遺伝学的研究により、原因となる遺伝子変異やリスク因子が同定されており、分子生物学的研究によって各疾患において特定のタンパク質の機能喪失及び獲得、構造異常や異常凝集等が生じており、多くの神経変性疾患では異常タンパク質の蓄積が明らかにされている (7)。しかしながら、いずれの疾患に関しても、発症までのプロセスは未だ解明されておらず、これらの疾患の治療戦略として神経保護を目的とした研究が実施されている (8, 9)。本研究では、この神経保護を目的とした治療戦略として、神経栄養因子の一種である VGF nerve growth factor inducible (VGF) に着目した。

VGF は、ラット副腎褐色細胞腫において神経成長因子 (Nerve growth factor: NGF)により発現誘導される因子として同定された (10)。VGF は、ヒトで 615 アミノ酸、マウス及びラットで 617 アミノ酸より構成され、N 末端 1-22 アミノ酸に分泌シグナル配列を有する分泌型の前駆タンパク質であり (11)、この前駆タンパク質は Prohormoneconvertases1/3 及び 2 (PC1/3, PC2) 等のプロテアーゼにより切断を受け、種々の生理活性ペプチドが産生される (Fig. 1) (12)。

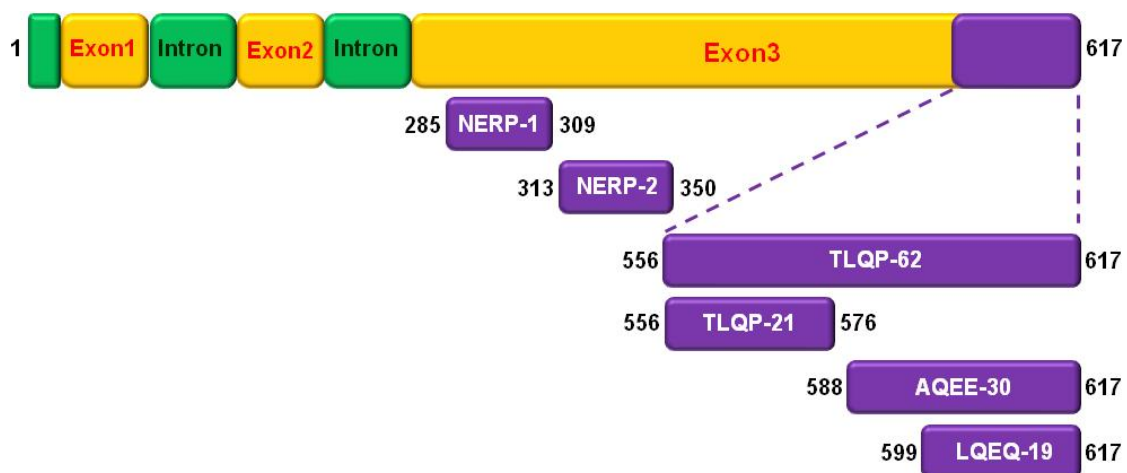


Figure 1. The *VGF* gene and its derived peptides.

The VGF polypeptide is the precursor of several biologically active peptides, which are released and play a role in intercellular communication. The gene contains a number of specific sequences, which are highly conserved between the species and these represent potential cleavage sites for the convertases of the kexin/subtilisin-like series proteinases family, namely prohormone convertases -1/3 and -2.

代表的な生理活性ペプチドとして、Neuroendocrine regulatory peptide-1, -2 (NERP-1, -2)、TLQP-62、TLQP-21、AQEE-30、LQEQ-19 等がある (12-14)。個々の生理活性としては、海馬神経ニューロンの発火促進 (15)、抗うつ作用 (16,17)、神経新生 (17) や膵臓 β 細胞におけるインスリン分泌促進 (18) 等が報告されている。これらの生理活性ペプチドは中枢あるいは末梢の神経細胞や膵臓、下垂体前葉、副腎髄質、消化管等の内分泌細胞に発現しており、臓器毎に発現量の特異性が認められている (19, 20)。中でも中枢神経系における発現についての知見が多く、脳下垂体、大脳皮質や海馬等の神経細胞、脊髄感覚神経細胞等で高い発現がみられる (21,22)。近年の研究において、特定の病態下で VGF の発現量に変化が認められている。例えば、ALS や統合失調症、うつ病等と VGF 発現量との因果関係が示唆され、疾患バイオマーカーとしての役割を有する可能性が考えられている (23-26)。また、VGF の強制発現が網膜神経節細胞の生存に対して促進的な効果を示したこと、VGF 発現を促進させる薬剤により、小胞体スト

レス誘発の神経細胞死が抑制されたこと等が報告されている (27)。さらに VGF は、脳由来神経栄養因子 (Brain derived neurotrophic factor: BDNF) や Neurotrophin-3 等の神経栄養因子が細胞外受容体に作用することにより誘導される (15,28)。これらの報告より、VGF 由来ペプチドは、神経細胞の生存に重要な役割を果たしていることが考えられる。しかし、現在神経変性疾患に対する VGF 由来ペプチドの作用を検討した報告はなく、どの様な疾患に対して適応が可能であるのか、また数ある VGF ペプチドのうち、神経保護作用を有するものがあるならばその特定を行う必要がある。

本研究では、まず第 1 章において、ハンチントン病モデルに対する VGF 発現誘導薬及び VGF 由来ペプチドの保護作用の解析及び作用機序の解明を行った。第 2 章では、ALS モデル細胞を使用し神経保護作用を有する VGF 由来ペプチドの探索を実施した。第 3 章では、ヒト ALS 患者脊髄組織標本を用いて、脊髄における VGF の分布及び ALS 病態下における VGF の発現変化について検討を行った。

第1章 ハンチントン病モデルに対する VGF の作用

第1節 緒言

ハンチントン病は人体に普遍的に発現している Huntingtin タンパク質の変異を原因とする優性遺伝性の神経変性疾患である (3)。我が国では特定疾患に認定されており、日本人の有病率は 100 万人に 5~6 人未満である一方、海外とくに白人 (Caucasian) の有病率が高く、10 万人に 4 人~10 人といわれている (29)。変異遺伝子を持つ場合は 40 歳前後に高確率で発症し、10~20 年かけて進行する (30)。Huntingtin タンパク質をコードする *Huntingtin* 遺伝子の第 1 エクソンには、CAG (グルタミンをコードする) の反復配列が存在する。非病原性遺伝子では 11~34 コピーの反復配列であるのに対し、病原性遺伝子では 37~876 コピーの反復配列が存在し、繰り返しが多いほど重篤かつ若年発症であることが知られている。変異 Huntingtin (Mutant Huntingtin: mHtt) は凝集体を形成することにより線条体の 90%を占める中型有棘神経細胞 (Medium spiny neurons: MSNs) の細胞死を引き起こし、MSNs の脱落による運動、認知及び行動の障害を来す (31)。また、ハンチントン病病態における神経細胞脱落の原因の一つとして、mHtt の凝集蓄積が挙げられる。mHtt の凝集蓄積には異常タンパク質分解機構の一つである小胞体関連分解 (Endoplasmic stress-associated degradation: ERAD) の障害が示唆されているが未だ不明な点が多い (32)。現在、ハンチントン病に対する治療法として、舞踏運動等不随意運動及び精神症状改善を目的としたドパミン受容体遮断作用を示す抗精神病薬を用いた対症療法が行われている。また、近年ハンチントン病に伴う舞踏運動の治療薬としてテトラベナジンが海外で使用されるようになり、我が国でも 2017 年に承認された。その他、動物試験において、クレアチン、CoQ₁₀、リルゾール、胆汁酸誘導体、多糖体等の投与が試みられているが、現在のところ有効性は明らかとなっていない。このように、ハンチン

トン病に対する治療は対症療法に限定されており、根治が期待できる治療薬の開発が望まれている。

アルツハイマー病 (33)、パーキンソン病 (34)、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis:ALS) (35) 等の代表的な神経変性疾患に加え、ハンチントン病の病態形成メカニズムに小胞体ストレスが関与することが報告されている (36)。小胞体ストレスは、小胞体内腔で正常に折りたたまれなくなった不良タンパク質の蓄積によって生じる細胞障害性のストレスである。ハンチントン病の発症は mHtt の蓄積に起因することからも、小胞体ストレスと関連があることは容易に想像できる。しかし、小胞体ストレスを抑制あるいは改善する医薬品は、まだ開発されていない。

過去の報告においてにおいて、神経変性疾患に対する新規の化合物 SUN N8075、(2S)-1-(4-Amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-{4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl}-2-propanol dimethanesulfonate が見い出された。SUN N8075 は抗酸化作用と、Na⁺及び T 型 Ca²⁺チャネルの阻害作用を有する化合物である (37)。SUN N8075 は *in vivo* における一過性中大脳動脈閉塞(38)、パーキンソン病 (39)、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 誘発及び高眼圧誘発網膜障害(40)、ALS の各種モデルに対し、抗酸化作用や (38-40) 神経成長因子 VGF nerve growth factor inducible (VGF) の発現上昇によって神経保護作用を示した (27)。また、SUN N8075 は神経芽細胞種 SHSY-5Y 細胞において、ツニカマイシン添加による小胞体ストレス誘発細胞死に対して保護作用を示した (27)。これらの知見より、ハンチントン病の病態形成メカニズムに小胞体ストレスが深く関与することから、SUN N8075 は保護作用を有し、ハンチントン病に対する新規医薬品の候補化合物になり得ると考えられる。

本章では VGF 及び VGF 誘導薬である SUN N8075 のハンチントン病に対する

保護作用を検討した。具体的には、*in vitro* 試験系でハンチントン病モデル細胞 STHdhQ111/Q111 及びその対照である STHdhQ7/Q7 を用いて、また、*in vivo* 試験系においてはハンチントン病モデルマウスである R6/2 マウス (mHtt 過剰発現マウス) を用いて、各種被験薬の作用を比較検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、トリプシン (Trypsin)、Mouse anti- β -actin antibody、Radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II、IIIは Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Fetal bovine serum (FBS) は Valeant (Costa Mesa, CA, USA)、ペニシリン (Penicillin)、ストレプトマイシン (Streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、Hoechst 33342、Propidium iodide (PI) は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、Dimethylsulfoxide (DMSO)、Blocking One-P は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、BCA protein assay kit、Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG antibody、peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody は Thermo Fisher Scientific Inc. (Franklin, MA, USA)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2-メルカプトエタノール含有 4×sample buffer solution、10% SDS-polyacrylamide gel、ImmunoStar[®]LD は Wako (Osaka, Japan)、polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P) は Millipore (Bedford, MA, USA)、Can Get Signal 1、2 は TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan)、Rabbit anti-phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) antibody、Rabbit anti-total-ERK1/2 は Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II は Takara bio Inc. (Shiga, Japan)、U0126 は

Promega Corporation (Madison, WI, USA)、SUN N8075 は Asubio Pharma Co., Ltd. (Kobe, Japan) (現第一三共株式会社) より恵与されたものを使用した。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

STHdhQ7/Q7 及び STHdhQ111/Q111 細胞は、Coriell institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) より購入した。本細胞はマウス線条体前駆細胞を起源とする細胞で、STHdhQ7/Q7 及び STHdhQ111/Q111 はそれぞれ 7 または 111 個のグルタミンリピートを有するヒト Huntingtin タンパク質を発現している。

STHdhQ7/Q7 及び Q111/Q111 細胞は、10% FBS、100 U/ml ペニシリン及び 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いて、33°C、5% CO₂ 中にて培養した。また 3 日毎にトリプシン処理により継代を行った。

2-2-2 細胞死の評価

STHdhQ7/Q7 及び STHdhQ111/Q111 細胞を 5,000 cells/well で 96 well プレートに播種し、5% CO₂、33°C で 24 時間培養した。その後、培地を FBS 不含の DMEM もしくは 3% FBS 含有の DMEM に交換した。この時、SUN N8075 は DMSO に溶解し、1% DMSO 含有 Phosphate buffered saline (PBS) で終濃度 0.1、0.3、1、3 µM となるように希釈して添加した。また、MEK 阻害薬 U0126 を用いた実験では、U0126 は DMSO に溶解させ、1% DMSO PBS で終濃度 10 µM となるよう調製し、SUN N8075 と同時に培地に添加した。VGF ペプチドを用いた実験では、AQEE-30、TLQP-21 は PBS に溶解させて培地に添加した。試薬添加 12 時間後、培養細胞に対し Hoechst33342 (終濃度 8 µM) と PI (終濃度 1.5 µM) を添加することにより核染色を行った。核の形態は蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察し

た。死細胞率は、撮影した写真より、PI 陽性細胞数 (死細胞) 及び Hoechst 33342 陽性細胞数 (生細胞+死細胞) を計測し、Hoechst33342 陽性細胞に対する PI 陽性細胞の比として値を算出した。平均値を各群で求め、それぞれの死細胞率を比較した。

2-2-3 ウェスタンブロット解析

2-2-3-1 試料採取

STHdhQ7/Q7 及び STHdhQ111/Q111 細胞を 24 well プレートに 2.5×10^4 cells/well で播種した。培養 24 時間後、培地を FBS 不含または 3% FBS 含有の DMEM と交換し、2-2-3-2 と同様に SUN N8075 を希釈し、終濃度 3 μ M となるように添加して 6 時間インキュベートした。その後、PBS で洗浄を行った後 RIPA buffer (50 mM Tris 溶液 pH 8.0、150 mM NaCl、1.0% Igepal CA-630、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS 含有) 1 ml に対し Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II 及び III をそれぞれ 10 μ M ずつ混合した試薬を 25 μ l 加えて溶解し、マイクロチューブに回収した。その後 30 分間氷上に静置し、4°C、10,000 \times g で 10 分間遠心してから -80°C で保存した。

2-2-3-2 タンパク質定量

タンパク質定量は、BCA protein assay kit を用いて行った。検量線作成のために 0、12.5、25、50、125、250、500、750、1,000、1,500 及び 2,000 μ g/ml の濃度に調製した Bovine serum albumin を用いた。それぞれのタンパク質抽出液は、RIPA buffer で 2 倍に希釈して用いた。BCA protein assay kit の A 液と B 液を製品プロトコールに従って混合した Working reagent をサンプルに添加し、37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を Varioskan Flash

(Thermo Scientific, MA, USA) を用いて測定した。タンパク質濃度は Sample Buffer Solution 及び RIPA buffer を用いて調整し、-80°C に保存した。

2-2-3-3 電気泳動及び転写

タンパク質濃度を調整したサンプルを-80°C から取り出し、氷上で融解させた後、100°C で 5 分間煮沸処理し室温にて軽くスピンドウンした。1 well あたりの添加量は分子量マーカー 5 μ l、各サンプル 15 μ l とした。サンプル添加後、ゲル 1 枚あたり 20 mA で 90 分間電気泳動した。泳動後、ゲルを Cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-Amino hexanoic acid) に 15 分間浸漬した。転写膜はメタノールに 30 秒間浸漬し、超純水に 15 分間浸漬した。その後、Anode buffer 2 (25 mM Tris) に 15 分間浸漬した。陽極側から、Anode buffer 1 (0.3 M Tris) に浸したろ紙、Anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の Cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。

2-2-3-4 ウェスタンブロッティング

転写後、0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (T-TBS: 10 mM tris、40 mM Tris hydrochloride、15 mM NaCl) で洗浄し、Block One-P または T-TBS で 10 倍希釈したブロックエースに浸して、それぞれ 30 分または 1 時間ブロッキングした。その後 T-TBS で 15 分間、3 回洗浄し、Can get signal solution 1 または T-TBS で 10 倍希釈したブロックエースで希釈した一次抗体に浸し、それぞれ低温で一晩振とうした。その後再び T-TBS で 15 分間、3 回洗浄し Can get signal solution 2 または T-TBS で 10 倍希釈したブロックエースで希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間振とうした。T-TBS で 15 分間、3 回洗浄した後、ImmunoStar[®]LD に 5 分浸した。その後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo,

Japan) 及び Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いて検出、解析を行った。

一次抗体には、Rabbit anti-phospho-ERK1/2 (1/1,000)、Rabbit anti-total-ERK1/2 (1/1,000)、Mouse anti- β -actin (1/2,000) を、二次抗体には、Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1,000)、Peroxidase conjugated goat anti-mouse (1/1,000) を用いた。

2-2-4 定量的 RT-PCR 法

2-2-4-1 試料採取及び RNA 抽出

2-2-3-1 と同様に細胞の播種、培地交換、試薬添加を行った。また、U0126 を用いた実験では、U0126 は DMSO に溶解させ、1% DMSO PBS で終濃度 10 μ M となるよう調製し、SUN N8075 と同時に培地に添加した。RNA の抽出は NucleoSpin[®] RNA II (Takara bio Inc., Shiga, Japan) を用いて RNA 抽出を行った。

2-2-4-2 逆転写反応

抽出した RNA の濃度は、260 nm の波長で分光測定し求めた。第 1 鎖 cDNA は PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用い 10 μ l 合成した。

2-2-4-3 リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara bio Inc., Shiga, Japan) を用いて行った。PCR 反応液は SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μ l、各 primer 0.08 μ l、サンプル 1 μ l、滅菌蒸留水 8.84 μ l の計 20 μ l になるように調製した。PCR 反応は初期変性を 95°C で 30 秒間行った後、95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。PCR 反応に用いた primer の配列を以下に示す。

VGF mRNA; 5'-GGCTGTTCTATTTAATCGTCTGAAG-3' (forward)

5'-GGGTAAGTTCACAGCAATTTGGA-3' (reverse)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA;

5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' (forward)

5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3' (reverse)

なお、GAPDH は内部標準として用いた。

2-2-5 蛍光免疫染色

STHdh 細胞を Lab-Tek II Chamber Slide system を用いて 24 時間培養し、培地交換の際に SUN N8075、AQEE-30 をそれぞれ終濃度 3 μ M となるように添加した。試料添加から 12 時間後、PBS で洗浄し、4% Paraformaldehyde を用いて室温で 15 分間固定を行った。PBS で希釈した 0.2% Triton X-100 を用いて 10 分間の透過処理を行った後、3% Normal goat serum 含有の PBS で 30 分間ブロッキングを行った。Can Get Signal[®] Immunostain solution A で希釈した一次抗体に浸し、低温で一晩振とうした。その後、T-TBS で 3 回洗浄を行い、T-TBS で希釈した二次抗体に浸して遮光しながら室温で 1 時間振とうした。T-TBS で 3 回洗浄した後、Hoechst/PBS (0.12 μ g/ml) を添加し、遮光しながら室温で 5 分間インキュベートした。PBS で 5 回洗浄を行い、スライドガラス上にフルオロマウントを用いて封入を行った。

一次抗体には、Anti-huntingtin Monoclonal antibody, clone 4A4. 2 (1/400) を、二次抗体には、Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse antibody (1/1000) を用いた。

2-2-6 *In vivo* 評価系

2-2-6-1 実験動物

雄性及び雌性の R6/2 (B6CBA-TgN[HDexon1]62Gpb) マウスは Jackson

Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。R6/2 マウスはハンチントン病様症状を示し、13~14 週齢で死亡する系統である (41)。すべてのマウスは設定温度 24°C (許容範囲: 22-26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00) に維持された岐阜薬科大学の動物飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製のケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を使い、自由給水下にて固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) により飼育した。試験はすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けたうえで実施した。また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学バイオセーフティー委員会に遺伝子組換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

2-2-6-2 薬物投与

SUN N8075 は 6% Captisol solution に溶解させ、生後 4 週から死亡するまで 30 mg/kg/day で皮下投与を行った。Control 群には 6% Captisol solution を 10 ml/kg で皮下投与した。なお、本薬剤は過去の検討において 3-30 mg/kg で反復投与が行われており、有効性及び忍容性が確認されている (27, 38-40)。

2-2-6-3 発症と生存期間

30 秒間正向反射が認められなかった時点を死亡とみなし、死亡までの日数を記録した。また、Clasping response (抱擁反射) を発症の指標として用いた。

Clasping response はマウスを地面から 30 cm の高さで 1 分間尾懸垂して観察した。

2-2-6-4 ローターロッド試験

本試験は小動物用ローターロッド装置 (Bio Medica Ltd., Osaka, Japan) を用い

て、直径 3cm の回転式ロッド上を繰り返し歩行させ、運動機能保持能力を評価する方法である。21 日齢から 1 週間、5 rpm で回転させたロッド上を 5 分間歩行させた (訓練試行)。測定試行は、5 rpm で回転させたロッド上を歩行させ、マウスが落下するまでの滞在時間を測定した (最大 10 分間)。一回の試行につき 3 回行い、最も長い滞在時間を記録した。測定は週に 1 回実施した。

2-2-6-5 線条体凍結組織切片作製

生後 10 週目の R6/2 マウスをペントバルビタールナトリウム (80 mg/kg, i.p.) で麻酔後、2%パラホルムアルデヒド溶液で灌流し、摘出した全脳は同液中に 24 時間浸漬した。続いて 25%スクロースに 4°C で 24 時間浸漬した。O.C.T. compound にて全脳を包埋し、速やかに液体窒素で凍結させ、薄切するまで -80°C で保存した。Bregma + 0.14 mm の薄切切片を線条体切片とした。

2-2-6-6 Cresyl violet 染色

凍結切片を -80°C より取り出し -20°C で 1 時間放置した後、室温で 1 時間乾燥させた。0.01 M PBS (pH 7.4) に浸漬して O.C.T. compound を洗浄した。その後、0.1% Cresyl violet 溶液に 10 分間浸して染色後、蒸留水で 2 分間 2 回洗浄し、70%、95%、99%、無水エタノールの順に 3 分間ずつ浸漬し脱水した。キシレンに 5 分間 2 回浸漬し透徹した後、EUKITT にて封入した。

2-2-7 統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test、Dunnett's test (JSTAT for windows; Vector, Tokyo, Japan) 及び log-rank test (StatView-J 5.0 for windows; SAS institute inc., NC, USA) を用いた。実験結果は平均値 ± 標準誤差で表し、危険率 5 %以下を有意とした。

第3節 実験成績

3-1 STHdh 細胞に対する SUN N8075 の保護作用

ハンチントン病では酸化ストレス (42)、小胞体ストレス (43) 等の種々のストレスが関与することが知られており、本研究ではより広範なストレスを惹起する血清除去を用いて *in vitro* の実験を行った。はじめに、mHtt により誘発される細胞死に対する SUN N8075 の保護作用について検討した。蛍光顕微鏡写真を Fig. 2A に、全細胞数に対する PI 陽性細胞数を Fig. 2B に示した。STHdhQ7/Q7 及び STHdhQ111/Q111 細胞の両方で Control 群に対して Vehicle 群では有意に細胞死が増加していた (Fig. 2B)。SUN N8075 は 0.3 μ M より有意に細胞死を抑制し、その保護作用は濃度依存的に増大した (Fig. 2B)。

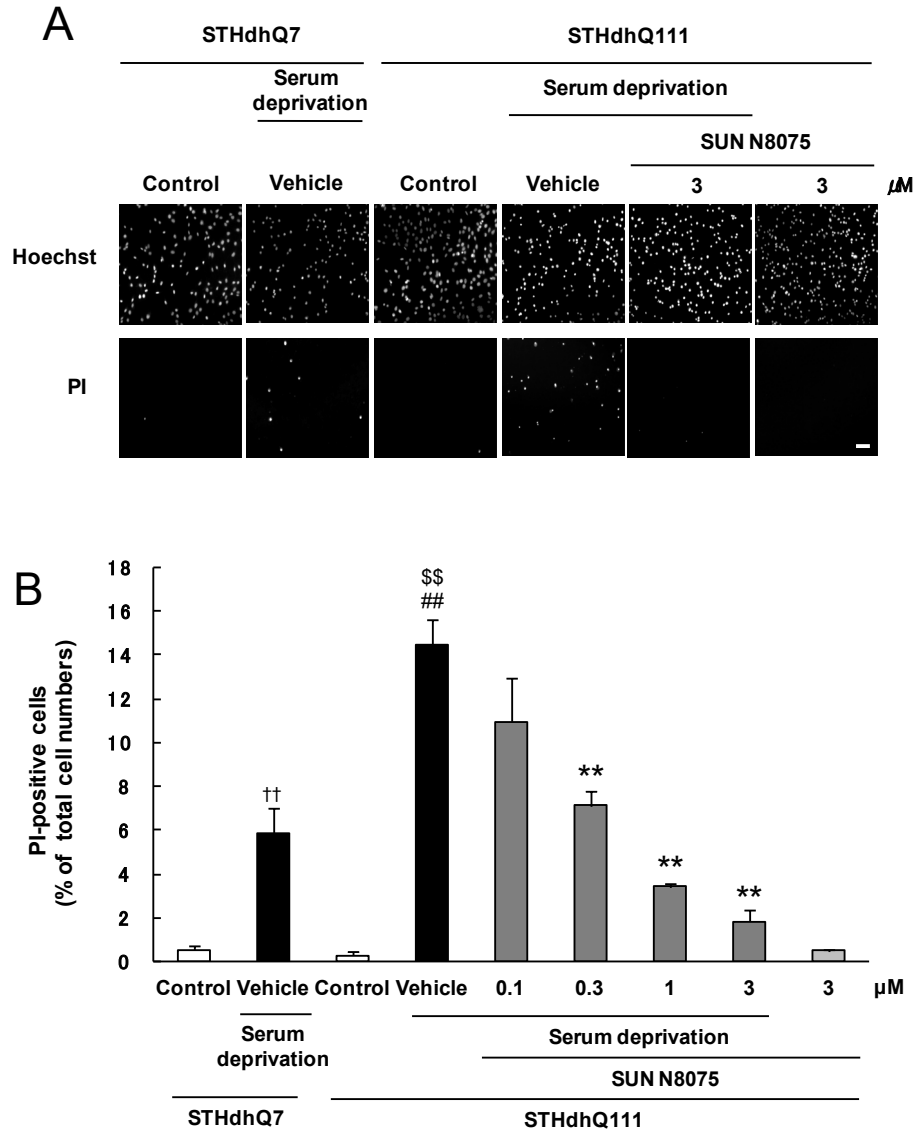


Figure 2. The effects of SUN N8075 on STHdh cell survival.

(A) Representative fluorescence microscopic image of Hoechst33342 and propidium iodide (PI) staining. Scale bar represents 100 μm . (B) The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells. SUN N8075 treatment significantly decreased PI positive cells. Values are mean \pm SEM ($n = 5$). ** $P < 0.01$ vs. Vehicle group in STHdhQ111 (Dunnett's test), ## $P < 0.01$ vs. Vehicle group in STHdhQ7 (Student's t -test), †† $P < 0.01$ vs. Control group in STHdhQ7 (Student's t -test), \$\$ $P < 0.01$ vs. Control group in STHdhQ111 (Student's t -test).

3-2 SUN N8075 添加による ERK1/2 リン酸化レベルの変化

SUN N8075 の作用機序を明らかにするために、細胞生存に関与する ERK1/2 のリン酸化についてウェスタンブロット法を用いて検討した。Fig. 3A に実験プロトコールを示した。SUN N8075 単独処置 1 時間後において、ERK1/2 のリン酸化レベルが上昇した (Fig. 3B)。続いて、血清除去条件において SUN N8075 の ERK1/2 リン酸化に及ぼす影響を検討した。Fig. 3C に典型例を、定量結果を Fig. 3D に示した。STHdhQ111/Q111 細胞において、血清除去 1 時間後の ERK1/2 リン酸化レベルは低下しており (Fig. 3D)、SUN N8075 の添加により ERK1/2 のリン酸化レベルは有意に上昇した (Fig. 3D)。

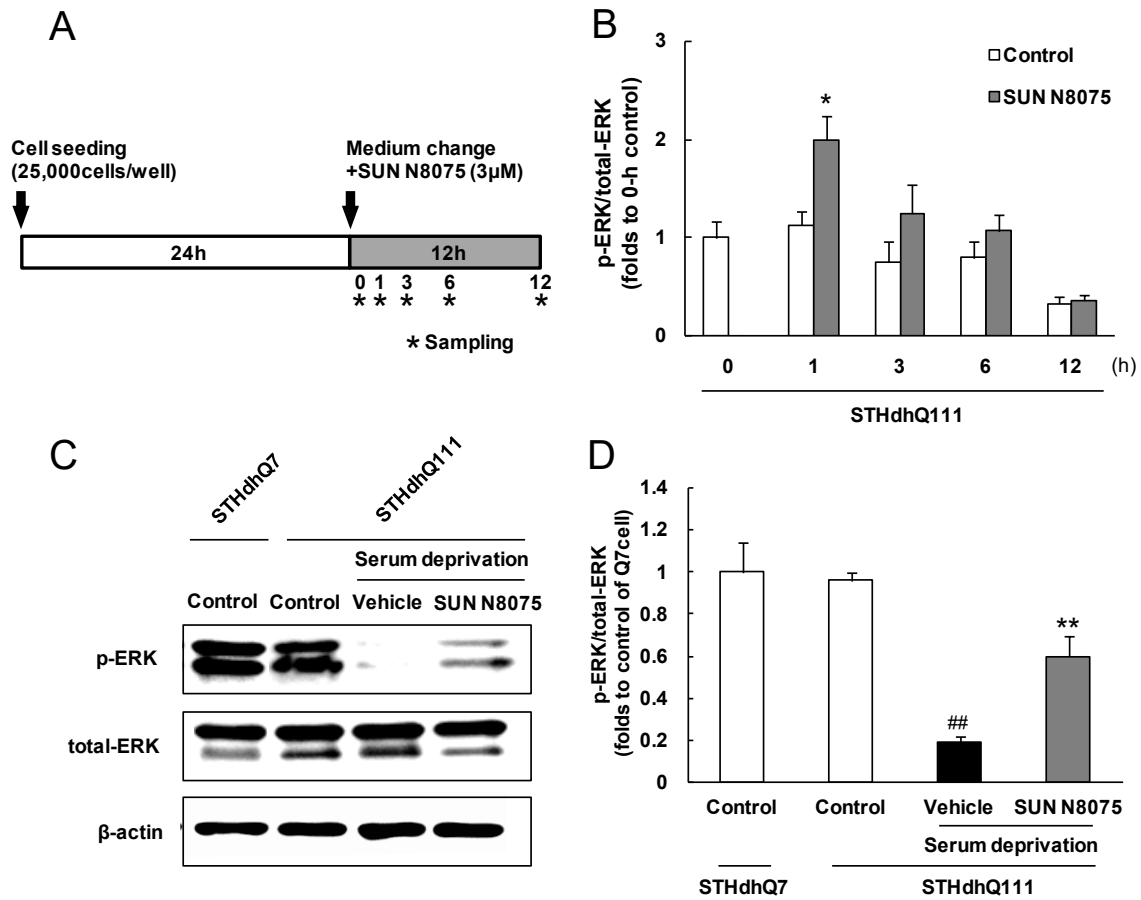


Figure 2. The effects of SUN N8075 on phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2).

SUN N8075 treatment increased phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) in STHdh cells. (A) Schematic depiction of the experiment in Fig. 2A. (B) Time-dependent change in p-ERK1/2 expression level was assessed by western blotting. Treatment with SUN N8075 (3 μM) upregulated the phosphorylation of ERK1/2 1 h after treatment. $*P < 0.05$ versus 1 h control group in STHdhQ111 (Student's *t*-test). (C) Membranes showing the immunoreactive bands of ERK1/2. (D) p-ERK1/2 expression was significantly increased 1 h after treatment with SUN N8075 (3μM) under the starvation stress condition. Values are mean \pm SEM ($n = 4$). $^{##}P < 0.01$ versus control group in STHdhQ111 (Student's *t*-test), $^{**}P < 0.01$ versus vehicle group in STHdhQ111 (Student's *t*-test). ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2.

3-3 STHdh 細胞に対する VGF ペプチドの作用

当研究室において、ALS 病態における運動神経障害に対して、SUN N8075 は分泌ポリペプチドである VGF の発現上昇を介して神経保護作用を示すことを報告した (27)。そこで、ハンチントン病病態における VGF ペプチドの保護作用を検討した。Fig. 3A では STHdh 細胞における SUN N8075 の VGF 誘導作用について RT-PCR 法を用いて検討した。STHdhQ111/Q111 細胞の Control 群と比較して、血清除去 6 時間後の Vehicle 群において *VGF* mRNA 量は有意に低下した (Fig. 4A)。また、Vehicle 群に対し、SUN N8075 添加群では *VGF* mRNA 量が有意に上昇した (Fig. 4A)。VGF は酵素により切断されて種々のペプチドとして作用することが知られているため、代表的な VGF 由来ペプチドである AQEE-30 及び TLQP-21 について核染色を用いて細胞保護作用を検討した。全長 Rat VGF の略図を Fig. 4B に、核染色の定量結果を Fig. 4C、4D に示した。VGF の C 末端ペプチドである AQEE-30 は、STHdhQ111/Q111 細胞において濃度依存的な細胞保護作用を示した (Fig. 4C)。しかし、同じく VGF 由来ペプチドである TLQP-21 は STHdhQ111/Q111 細胞において細胞死を抑制しなかった (Fig. 4D)。

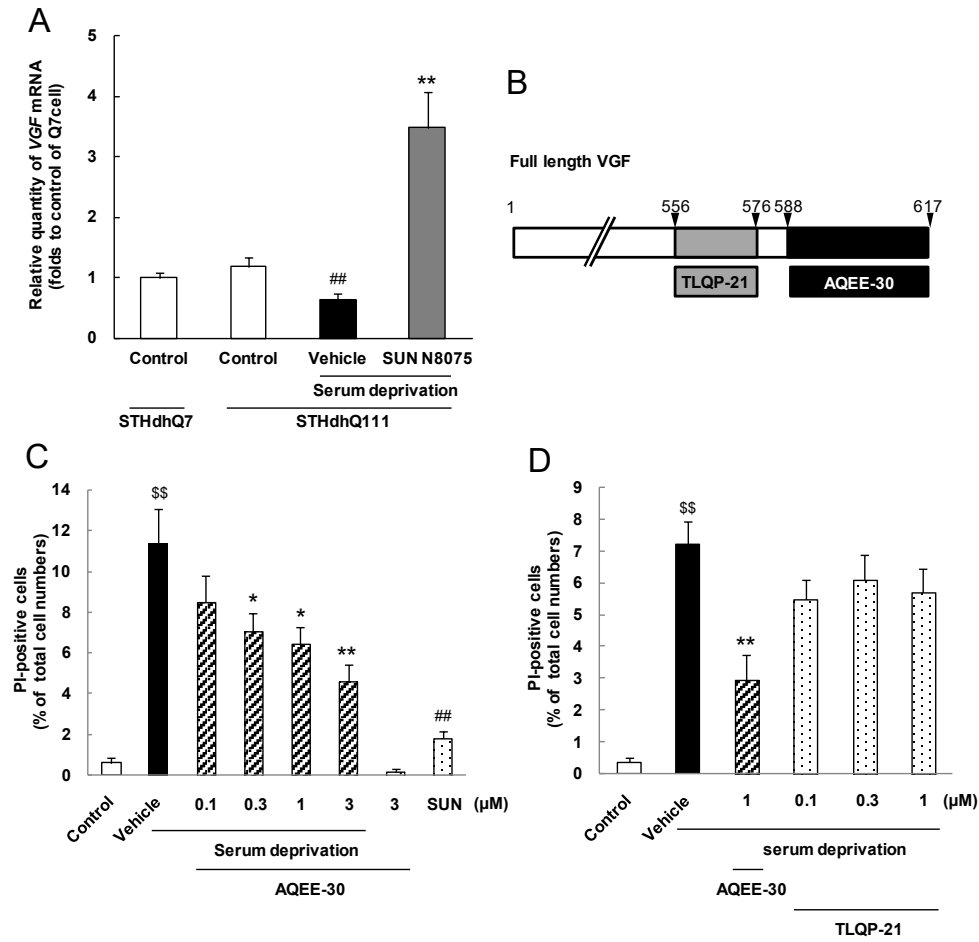


Figure 4. The effects of SUN N8075 on *Vgf* mRNA expression and neuroprotective effects of VGF peptides.

(A) Schematic depiction of the rat VGF precursor protein and peptides. (B) The graph shows the relative quantity of *Vgf* mRNA (folds to control of STHdhQ7 cells). The *Vgf* mRNA level in STHdhQ111 cells was significantly increased 6 h after treatment with SUN N8075 (3 μM). Values are mean ± SEM (n = 4). ^{##}*P* < 0.01 vs. Control group in STHdhQ111 (Student's *t*-test), ^{**}*P* < 0.01 vs. Vehicle group in STHdhQ111 (Student's *t*-test). (C) The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst 33342-positive cells. Treatment with AQEE-30 significantly decreased the number of PI-positive cells. SUN, 3 μM SUN N8075. Values are mean ± SEM (n = 6). ^{*}*P* < 0.05 vs. Vehicle group (Dunnett's test), ^{**}*P* < 0.01 vs. Vehicle group (Dunnett's test), ^{##}*P* < 0.01 vs. Vehicle group (Student's *t*-test), ^{\$\$}*P* < 0.01 vs. Control group (Student's *t*-test). (D) The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells. TLQP-21 exerted no effects on cell death of STHdhQ111 cells. Values are mean ± SEM (n = 4). ^{\$\$}*P* < 0.01 vs. Control group (Student's *t*-test), ^{**}*P* < 0.01 vs. Vehicle group (Student's *t*-test).

3-5 VGF ペプチドと SUN N8075 の変異 Huntingtin 凝集抑制作用

ハンチントン病における線条体細胞死の原因として、mHtt の凝集が知られている。そこで、mHtt の凝集に対する SUN N8075 と VGF 由来ペプチド AQEE-30 の作用について、蛍光免疫染色を用いて検討した。STHdhQ111/Q111 細胞の染色の典型例を Fig. 5A に、全細胞中の凝集体を含む細胞数を測定し、定量したものを Fig. 5B に示した。Control 群と比較して、血清除去を行った Vehicle 群では凝集体形成の増加が認められ、SUN N8075 及び AQEE-30 の処置により有意に凝集体形成は抑制された (Fig. 5B)。

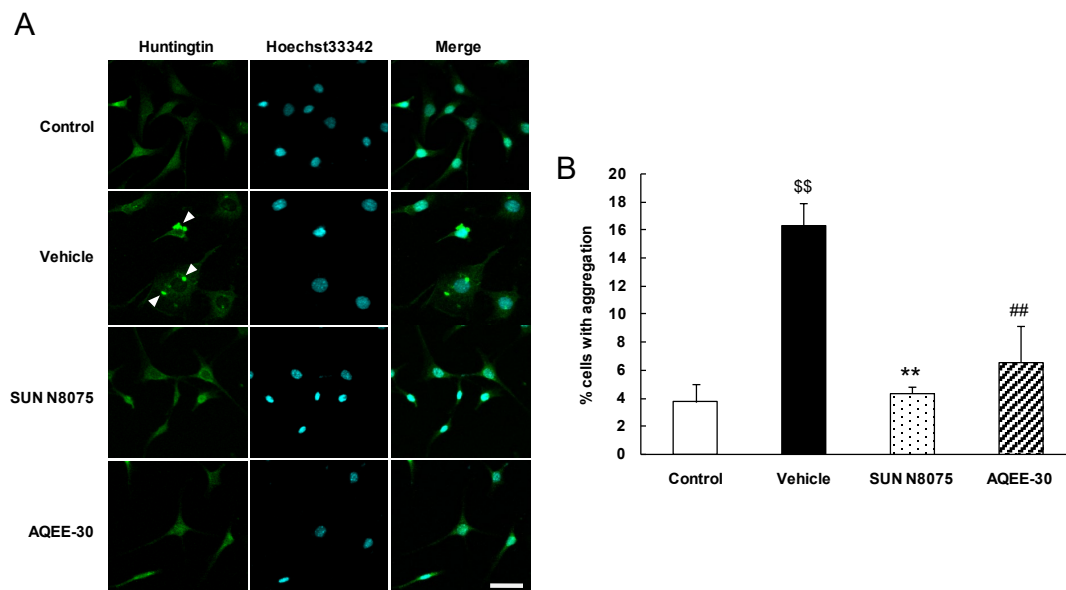


Figure 5. SUN N8075 and AQEE-30 inhibited the aggregation of mutant huntingtin.

(A) Images of confocal microscopy are shown. (B) The percentage of cells that include the aggregates to whole cells. Serum deprivation increased aggregation of mHtt in STHdhQ111 cells. In contrast, 3 μ M SUN N8075 and 3 μ M AQEE-30 inhibited the aggregation of mHtt. Scale bar = 50 μ m. Values are mean \pm SEM (n = 3 or 4). \$\$ P < 0.01 vs. Control group (Student's t -test), ** P < 0.01 vs. Vehicle group (Student's t -test), # P < 0.05 vs. Vehicle group (Student's t -test).

3-6 SUN N8075 の細胞保護作用に及ぼす MEK 阻害薬の影響

これまでの検討により、SUN N8075 はハンチントン病モデル細胞において細胞保護効果を示すことが確認された。また、VGF の発現量は MEK/ERK シグナル経路を介して制御されることが知られている (44)。そこで、MEK 阻害薬である U0126 と SUN N8075 を同時に処置した際の VGF 発現誘導作用及び細胞保護作用に及ぼす影響を検討した。VGF mRNA 量を Fig. 6A に示した。

STHdhQ111/Q111 細胞において、U0126 の添加は SUN N8075 による VGF mRNA の発現上昇を抑制した。また、U0126 の単独添加によって VGF mRNA の発現量は変化しなかった (Fig. 6A)。続いて、全細胞数に対する PI 陽性細胞数を Fig. 6B に示した。U0126 の添加により、SUN N8075 の添加で減少した死細胞率が増加した (Fig. 6B)。また、U0126 の単独添加によって死細胞率は変化しなかった (Fig. 6B)。U0126 は SUN N8075 による VGF の発現上昇を Vehicle 群と同等程度まで抑える一方、細胞死抑制効果に対しては完全には抑制してなかった。以上の知見は、SUN N8075 の細胞死抑制メカニズムの一部に、VGF の発現上昇が関与していることを示唆している。

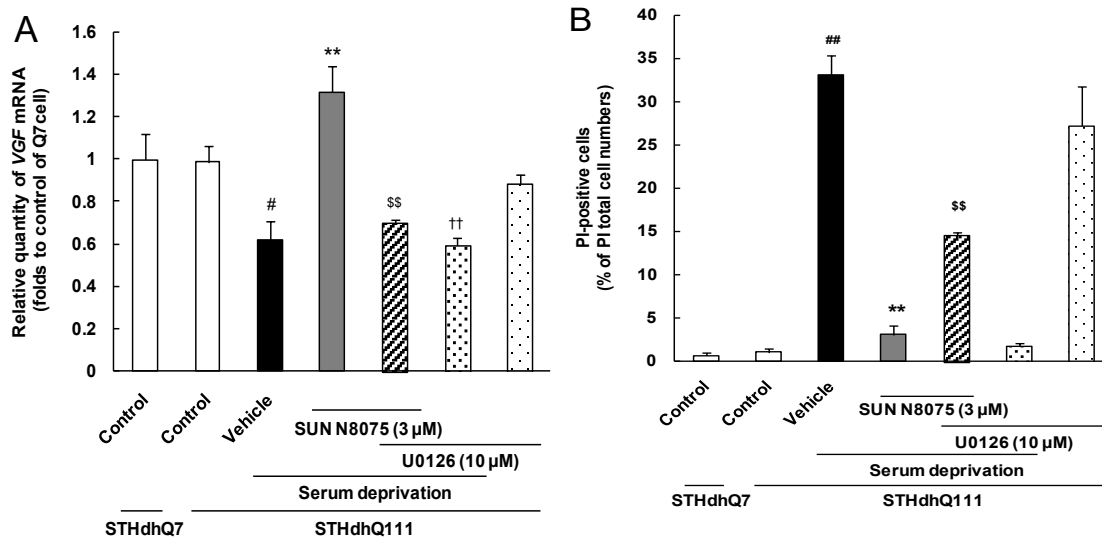


Figure 6. MEK inhibition suppressed the upregulation of *Vgf* mRNA and neuroprotective effects which are induced by SUN N8075.

(A) The graph shows the relative quantity of *Vgf* mRNA (folds to control of STHdhQ7 cells). U0126 (10 μ M) suppressed the upregulation of *Vgf* mRNA expression induced by SUN N8075 6 h after treatment. Values are mean \pm SEM (n = 4). # P < 0.05 vs. Control group for STHdhQ111 cells (Student's *t*-test), ** P < 0.01 vs. Vehicle group in STHdhQ111 (Student's *t*-test), \$\$ P < 0.01 vs. SUN N8075-treated group in STHdhQ111 (Student's *t*-test), †† P < 0.01 vs. U0126-treated group which was not serum free in STHdhQ111 cells (Student's *t*-test). (B) The number of cells exhibiting PI fluorescence was counted, and positive cells were expressed as the percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells. U0126 suppressed the neuroprotective effects of SUN N8075. Values are mean \pm SEM (n = 4). ## P < 0.01 vs. Control group in STHdhQ111 (Student's *t*-test), ** P < 0.01 vs. Vehicle group in STHdhQ111 (Student's *t*-test), \$\$ P < 0.01 vs. SUN N8075-treated group in STHdhQ111 cells (Student's *t*-test).

3-7 R6/2 ハンチントン病モデルマウスに対する SUN N8075 の作用

In vitro の実験より SUN N8075 は、ハンチントン病モデル細胞に対して保護作用を示した。そこで、ハンチントン病モデルマウスである R6/2 マウスを用いて検討を行った。R6/2 マウスへの SUN N8075 投与は、生後 4 週から開始した。Fig. 7A に R6/2 マウスの経時的な生存率を、Fig. 7B に体重変化を、Fig. 7C にハンチントン病発症の指標となる Clasp response の典型写真を、Fig. 7D にハンチントン病の発症時期を、Fig. 7E にローターロッド試験を用いた運動機能の経時変化を示した。SUN N8075 の投与 (30 mg/kg/day, s.c.) は R6/2 マウスの平均寿命を 25.0%延長させた ($P = 0.014$) (Fig. 7A) が、体重には影響を及ぼさなかった (Fig. 7B)。また、Clasp 反応の観察を行い、発症時期を検証したところ、SUN N8075 の投与により発症時期が有意に遅延したが ($P = 0.039$) (Fig. 7D)、ローターロッド試験による運動機能の評価では明らかな差は認められなかった (Fig. 7E)。

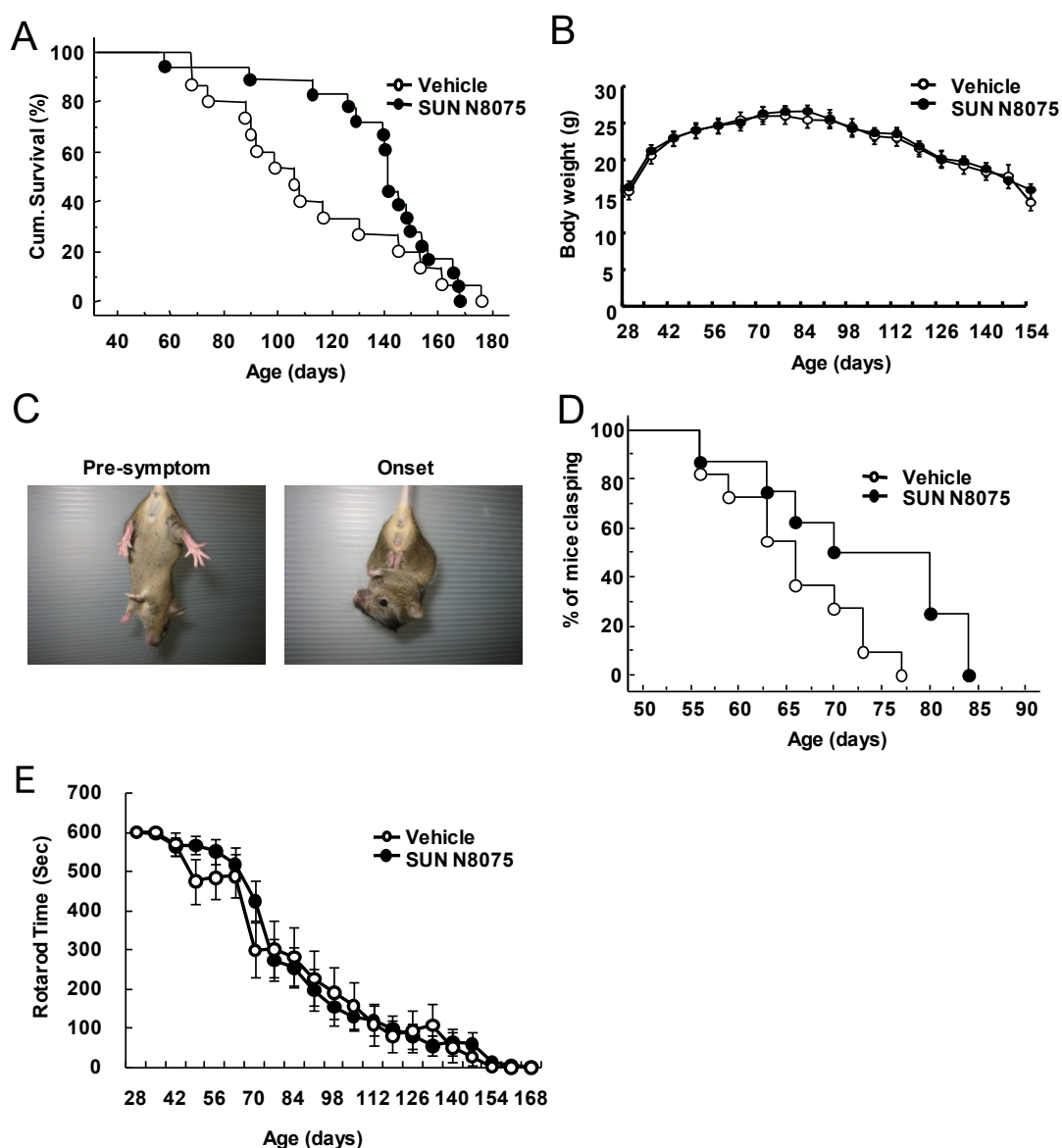


Figure 7. *In vivo* experiments to investigate the effects of SUN N8075 in R6/2 mice.

(A) The effects of SUN N8075 at 30 mg/kg/day, s.c., on survival in R6/2 mice. The mean survival of vehicle-treated and the SUN N8075-treated mice were 109.3 ± 8.7 ($n = 16$) and 137.2 ± 6.5 ($n = 18$), respectively. (B) The body mass curves from R6/2 mice during treatment with SUN N8075 did not differ from those of the vehicle-treated mice. Values are means \pm SEM (vehicle group, $n = 16$; SUN N8075 group, $n = 18$). (C) R6/2 mice at apresymptomatic age (age 8 weeks) and at the time of symptom onset (age 11 weeks). (D) Percentage of mice clasping in the vehicle-treated and SUN N8075-treated groups. Treatment with SUN N8075 significantly reduced the clasping phenotype in R6/2 mice. Values are means \pm SEM (vehicle group, $n = 11$; SUN N8075 group, $n = 8$). (E) The effects of SUN N8075 at 30 mg/kg/day, s.c., on motor performance of R6/2 mice in the rotarod test. There were no significant differences between the vehicle-treated and SUN N8075-treated mice. Values are means \pm SEM (vehicle group, $n = 16$; SUN N8075 group, $n = 18$).

3-8 R6/2 マウスの線条体細胞死に対する SUN N8075 の作用

10 週齢の R6/2 マウスにおいて、線条体神経細胞の脱落に対する SUN N8075 の作用を検討した。Fig. 8A-F にマウス脳の Cresyl violet 染色典型例を、Fig. 8G に線条体細胞数の定量結果を示した。SUN N8075 の投与により線条体における神経細胞死の減少が認められた。

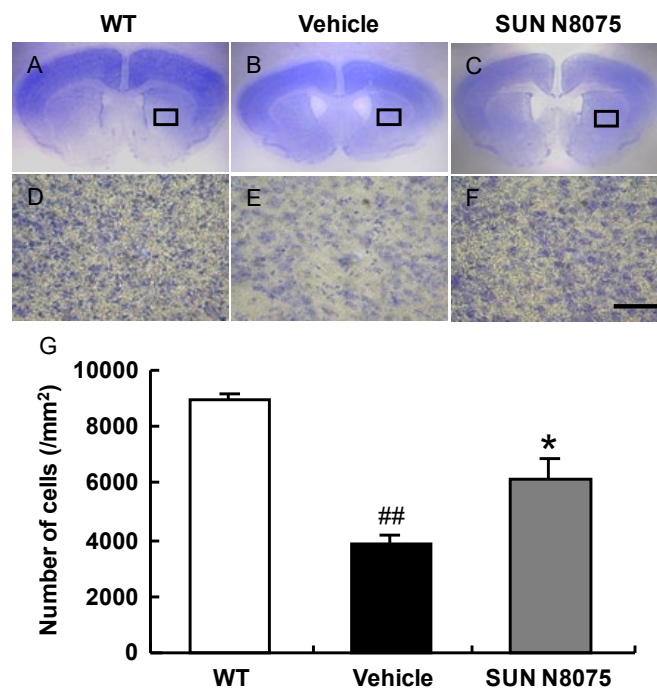


Figure 8. The effects of SUN N8075 on the decreasing numbers of striatal neurons in R6/2 mice.

(A-F) Cresyl violet staining performed in coronal sections through the striatum of R6/2 mice; (A, D) wild-type (WT), (B, E) vehicle-treated mice, and (C, F) SUN N8075-treated mice. Scale bar = 50 μ m. (G) The numbers of neurons in the striatum were significantly increased in SUN N8075-treated mice. Values are means \pm SEM (WT, n = 3; Vehicle group, n = 3; SUN N8075 group, n = 3). ## P < 0.01 vs. WT mice (Student's t -test), * P < 0.05 vs. Vehicle-treated mice (Student's t -test).

第4節 考察

本研究において、ハンチントン病モデル細胞である STHdhQ111/Q111 細胞に対して、VGF 及び VGF 誘導薬である SUNN8075 が保護作用を示すことを明らかにした。この細胞保護作用は、ERK1/2 のリン酸化を介した VGF の発現上昇に起因すると考えられる。また、SUNN8075 投与により R6/2 ハンチントン病モデルマウスの線条体における神経細胞障害の抑制、発症時期の遅延並びに寿命の延長が認められた。

VGF は中枢あるいは末梢の神経細胞や膵臓、下垂体前葉、副腎髄質、消化管等の内分泌細胞に発現している分泌ポリペプチドである (19,45)。VGF は Prohormone convertases1/3 及び 2 (PC1/3, PC2) により切断を受け、生成された種々のペプチドが生理活性を有する (12)。これまでに VGF は摂食行動やエネルギー恒常性の維持に関与することが報告されている (45)。また、神経保護作用を有するため、うつ病の改善や海馬シナプスの可塑性増進及び海馬歯状回の神経新生に関与することが知られている (15)。

本研究では、CAG リピートを有する STHdhQ111 細胞において、SUN N8075 は mHtt 誘発細胞死を抑制し (Fig.2)、血清除去ストレス条件下で減少した VGF mRNA の発現量を上昇させた (Fig. 4)。また、VGF ペプチドの一つである AQEE-30 は血清除去ストレス条件下で STHdhQ111 細胞の細胞死を抑制したが、同じく VGF ペプチドである TLQP-21 には細胞保護作用は認められなかった (Fig. 4)。さらに、SUN N8075 及び AQEE-30 は、mHtt の凝集を抑制した。これらの結果から、ハンチントン病病態では VGF の発現量が低下しており、SUN N8075 は VGF の発現量上昇を介して細胞保護作用を発揮することが示唆された。ハンチントン病病態に BDNF の減少が関与していることから、ハンチントン病と栄養因子には密接な関連が考えられている (46)。本検討により栄養因子の一

つである VGF も BDNF と同様に病態発症との関連が十分に考えられる。しかし、この仮説の立証には、臨床サンプルを用いた VGF の発現減少を確認する必要がある、今後更なる検討が必要である。

Vgf 遺伝子は BDNF 応答性の遺伝子であり (25)、BDNF、MEK、ERK1/2 等を介して活性化される。当研究室において、SUN N8075 は MEK/ERK シグナル経路の活性化による VGF の発現上昇を介して、小胞体ストレス誘発神経細胞死を抑制することを明らかにした (27)。さらに、mHtt の凝集に誘発される神経細胞死には ERK1/2 を不活性化させる MKP1 (Mitogen activated protein kinase phosphatase 1) 等のチロシン残基脱リン酸化酵素の発現上昇が関与している (47,48)。本研究では、STHdhQ111/Q111 細胞においてストレス条件下の ERK1/2 のリン酸化減少を確認しているが、その減少を SUN N8075 は顕著に抑制した (Fig. 3)。また MEK 阻害薬 U0126 は、SUN N8075 による *VGF* mRNA の発現上昇を抑制した (Fig. 6)。さらに、ERK1/2 のリン酸化は SUN N8075 添加 1 時間後に、*VGF* mRNA の発現上昇は添加 6 時間後に認められた (Figs. 3, 4)。これらの結果より、SUN N8075 は ERK1/2 の活性化を介して、VGF の発現量を上昇させていることが示唆された。最後に、MEK 阻害薬を処理することによって SUN N8075 による細胞保護作用が一部抑制されたことから、SUN N8075 は ERK1/2 の活性化を介して細胞保護作用を示したことが考えられる (Fig. 6)。

本実験の結果より、SUN N8075 は ERK1/2 の活性化を介して VGF の発現量を上昇させることが示唆されたが、SUN N8075 が MEK/ERK シグナル経路を活性化させる機序は不明である。当研究室の過去の報告より、SUN N8075 は BDNF、Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) 及び Neuropeptide Y (NPY) 等の神経栄養因子の発現に影響を及ぼさない (27)。今後、SUN N8075 のより詳細な作用メカニズムを明らかにするためには、MEK/ERK シグナル経路のさらに上流に存

在する因子についての検討を行っていく必要がある。

In vivo の検討において、SUN N8075 の投与により、R6/2 マウスの平均寿命は 25.0%延長された。リルゾール、ミノサイクリン及びシスタミン等の種々薬物が R6/2 マウスに対して検討されており、それぞれ 10.2%、14.0%、19.5%の平均寿命延長効果が報告されている (49-51)。これらの知見より、SUN N8075 の治療効果は、過去に検討された種々の化合物と比較してより強力であった。さらに、R6/2 マウスに SUN N8075 を処置することにより、発症の遅延 (Fig. 7D) 及び線条体神経細胞死の抑制が認められた (Fig. 8)。一方、体重及び運動機能に対して、SUN N8075 は作用を示さなかった。これらの結果から、SUN N8075 は神経細胞死の抑制を介して発症時期を遅延させることが示唆され、今後の検討において治療条件の改善や他の治療法との併用によってハンチントン病治療に供し得る可能性がある。

R6/2 マウスにおける SUN N8075 の作用機序解明並びに VGF とハンチントン病病態の関係性については更なる検討が必要であるが、本章の検討より、ハンチントン病の発症に VGF 発現の関与が示唆された。さらに、VGF 誘導薬 SUN N8075 がその治療薬の候補化合物になり得ることを明らかにした。第 2 章では、ハンチントン病と同様の神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症における VGF の役割について検討した。

第2章 筋萎縮性側索硬化症モデルに対する VGF 由来ペプチドの作用

第2節 緒言

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位及び下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性・脱落し、筋肉の萎縮や筋力低下、脱力を呈する進行性の神経変性疾患である (6)。平成 28 年度の推計によると、本邦における患者数は約 9,600 人とされており、年々増加傾向を示している。本疾患が中年以降に発症頻度が増加し、60~70 歳でピークを迎えることから、高齢化社会では更なる罹患数の増加が予想される。患者の約半数は発症後 3~5 年以内に死亡または人工呼吸器が必要な状態になり、意識が鮮明なまま運動機能が衰えていくため、その精神的苦痛は大きい。患者の約 90%が原因不明の孤発性であり、残りの 10%程度が特定の遺伝子変異が背景となって発症する家族性 ALS である (52)。孤発性 ALS の病因は未だ十分に解明されていないが、グルタミン酸毒性及びその受容体異常、酸化ストレス、小胞体ストレス、TDP-43 のユビキチン化された凝集体の蓄積等様々な病態仮説が提唱されている (6)。多くの家族性 ALS の原因遺伝子が報告されており、ALS に関する研究に遺伝子改変動物が汎用されている。中でも家族性 ALS の約 20%を占めているのが、1993 年に同定された Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の変異である。SOD1 酵素は酸化ストレスを減少させる働きがあり、SOD1 酵素の抗酸化機能不全及び SOD1 タンパク質の変異による毒性が ALS 病態形成の要因の一つとされている (52)。近年、ALS 病態で変異 SOD1 のタンパク質凝集体形成が生じていることから (53)、ALS に小胞体ストレスが深く関与していることが考えられる。

SOD1 変異には G93A を初めとして、G37R、G85R (54)、その他 H46R (55) 等が同定されている。これまで ALS 研究のために、ALS 様症状を呈する動物モデルの開発が行われてきた。実際、SOD1^{H46R} 変異を導入したマウスは下肢の麻

痺を生じた後、四肢の筋萎縮を来し、やがて死に至る (56)。SOD1^{G93A} 変異を導入したマウスは、運動ニューロンが進行性に脱落する等 ALS 様症状を認め、かつ SOD1^{H46R} 変異導入マウスよりも発症が早く、より効率的な実験が可能である (56)。また、SOD1^{G93A} 変異マウスにおいて、変異 SOD1 タンパク質が細胞内でミスフォールディング (タンパク質が正しく折りたたまれないで、正しい機能を示さないこと) を生じ小胞体に蓄積することにより小胞体ストレスを惹起することが知られている。これらの既報は、SOD1^{G93A} 変異マウスが ALS に対する小胞体ストレスの関与を研究するのに適した動物モデルであることを示している。また、*in vitro* 実験系ではマウス脊髄ニューロン由来細胞株を用いて SOD1^{G93A} 変異を容易に導入でき、細胞死のメカニズムを検証することが可能である。

現在臨床において使用可能な治療薬は、グルタミン酸 *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型受容体拮抗薬のリルゾール (リルテック®) 及びラジカルスカベンジャーであるエダラボン (ラジカット®) である。リルゾールは約 3 ヶ月の生存期間延長効果、エダラボンは ALS の症状を遅らせる効果があり一定の有効性が確認されているが、共に対症療法に過ぎず、依然として治療に対する満足度は低い (57-61)。そのため、ALS は新規治療法開発に繋がる病態解明及び効果的な治療法の開発が切望されている疾患である。第 1 章の検討により、VGF 誘導薬及び VGF 由来ペプチドである AQEE-30 は、ハンチントン病モデル細胞に対して保護作用を有することを明らかにした。本章では VGF の保護作用が更に広範の神経変性に対する有効性を検証すること及び小胞体ストレスが関与する ALS に対して VGF 由来ペプチドが有効か否かについて、SOD1^{G93A} 変異に起因する *in vitro* 実験モデルを用いて検証した。さらに、VGF 前駆タンパク質から産生される多数の VGF ペプチドの内、神経保護作用を有するペプチドの探索及びその最小化を試みた。今回使用した VGF ペプチドは TLQP-21、AQEE-30、AQEE-11、LQEQ-19、

QEEL-16、LENY-13 及び HVLL-7 である (Fig. 9)。

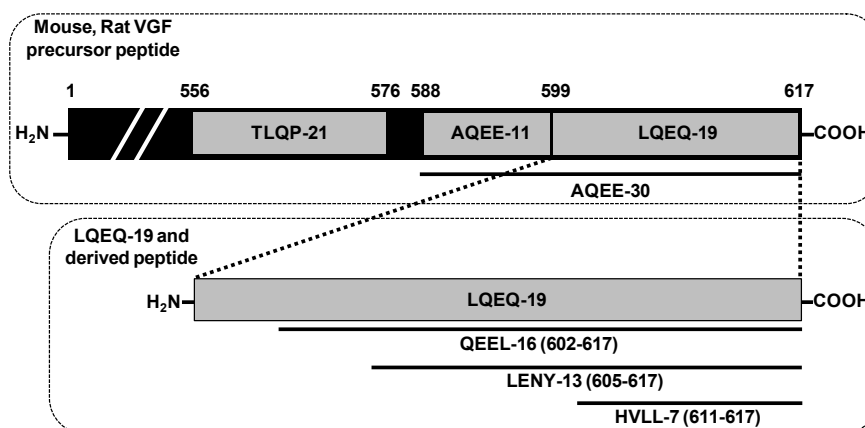


Fig. 9 Schematic depiction of the rat and mouse VGF precursor peptides, and their derived peptides, used in this study.

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。コンピテントセル (ECOSTM Competent *E. coli* DH5α) は Nippon gene (Tokyo, Japan)、Pure YieldTM Plasmid Midiprep System、Rabbit anti Halo-Tag polyclonal antibody (#G2981, Lot: 5301) は Promega (Madison, WI, USA)、アンピシリン (Ampicillin)、Lysogeny broth (LB) 培地、2-プロパノール (2-Propanol)、エタノール (Ethanol)、塩酸 (Hydrogen chloride;HCl)、デオキシコール酸ナトリウム (Sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2-メルカプトエタノール含有 4×sample buffer solution、ImmunoStar[®] LD、メタノール (Methanol)は Wako (Osaka, Japan)、Lipofectamine 2000 Reagent、Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Opti-MEM)、Propidium iodide (PI; #P3566, Lot: 1126449)、Hoechst 33342 (#H3570, Lot: 35598A)は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum:

FBS) は Valeant (Costa Mesa, CA, USA)、ペニシリン (Penicillin)、ストレプトマイシン (Streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) high glucose、トリプシン (Trypsin)、Tris-HCl (pH 8.0)、Protease inhibitor cocktail (#P8340)、Phosphatase inhibitor cocktail II (#P2850)、Phosphatase inhibitor cocktail III (#P5726)、は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Blocking One-P、グリシン (glycine)、Can Get Signal1、Can Get Signal 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、Tween 20 Solution (Tween)、トリス (Tris) は (Hercules, CA, USA)、マウス脊髄ニューロン由来細胞株 (NSC-34 細胞) は Cellutions (Tront, ON, Canada) よりそれぞれ購入した。PBS (Phosphate buffered saline) は、KCl、KH₂PO₄、NaCl、Na₂HPO₄ · 12H₂O を超純水 (MiliQ) に溶解し、調製した。Myc または Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 標識プラスミド (Mock) 及び変異 SOD1^{G93A} 発現プラスミドは、名古屋大学医学部大学院医学系研究科神経内科学 祖父江元教授より恵与されたものを使用した (62)。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養及び遺伝子導入

NSC-34 細胞は、10% FBS、100 U/ml ペニシリン及び 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM high glucose を用いて 37°C、5% CO₂ 中にて培養した。また、3~4 日毎にトリプシン処理による継代を行った。NSC-34 細胞は 96 穴プレート中に 7,000 細胞/well、24 穴プレート中に 35,000 細胞/well になるように抗生物質不含有の培地を用いて播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で一晩培養した。翌日各穴 50 µl の Opti-MEM、0.2 µg の Mock または SOD1^{G93A} 発現プラスミド及び 0.5 µl の Lipofectamine 2000 Reagent を混合・添加し、遺伝子導入を行った。遺伝子導入 6 時間後に抗生物質含有培地に交換した後、各時間において細胞を回収

し試験に用いた。なお、24 穴プレートを用いた場合の細胞、DNA 及び各試薬の量は、それぞれ 96 穴プレートの 5 倍量とした。遺伝子導入 6 時間後に抗生物質含有培地に交換し、さらに 42 時間後に 1%血清培地または無血清培地を用いて培地交換を行い、各種 VGF 由来ペプチドを終濃度 0.1-3 μ M となるように添加した。各染色は 1 章 2-2-2 に準じて実施した。

2-2-2 ウェスタングロブリング解析

本試験は、第 1 章 2-2-3 の方法に準じて行った。一次抗体は、Rabbit anti-ERK1/2 polyclonal antibody (1/1,000)、Rabbit anti-p-ERK1/2 monoclonal antibody (1/1,000)、Rabbit anti-Akt polyclonal antibody (1/1,000)、Rabbit anti-p-Akt monoclonal antibody (1/1,000) 及び Rabbit anti- β -actin polyclonal antibody (1/1,000) を使用した。

2-2-3 統計学的解析

統計学的解析は Student's *t*-test、Dunnett's test 及び Tukey's test (JSTAT for windows) を用いた。実験結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、危険率 5 % 以下を有意とした。

第3節 実験成績

3-1 *In vitro* ALS モデルに対する AQEE-30 の保護作用

In vitro ALS モデルに対する AQEE-30 及び LQEQ-19 の細胞保護作用を検討した。Hoechst 33342 及び PI 核染色による蛍光染色像の典型例を Fig. 10A に、全細胞数に対する PI 陽性細胞数を Fig. 10B, C に示した。Control 群に対して Vehicle 群では有意に死細胞率が増加した (Fig. 10B, C)。AQEE-30 は 0.3 μ M より、LQEQ-19 は 1 μ M より有意に細胞死を抑制し、その保護作用は濃度依存的に増大した。

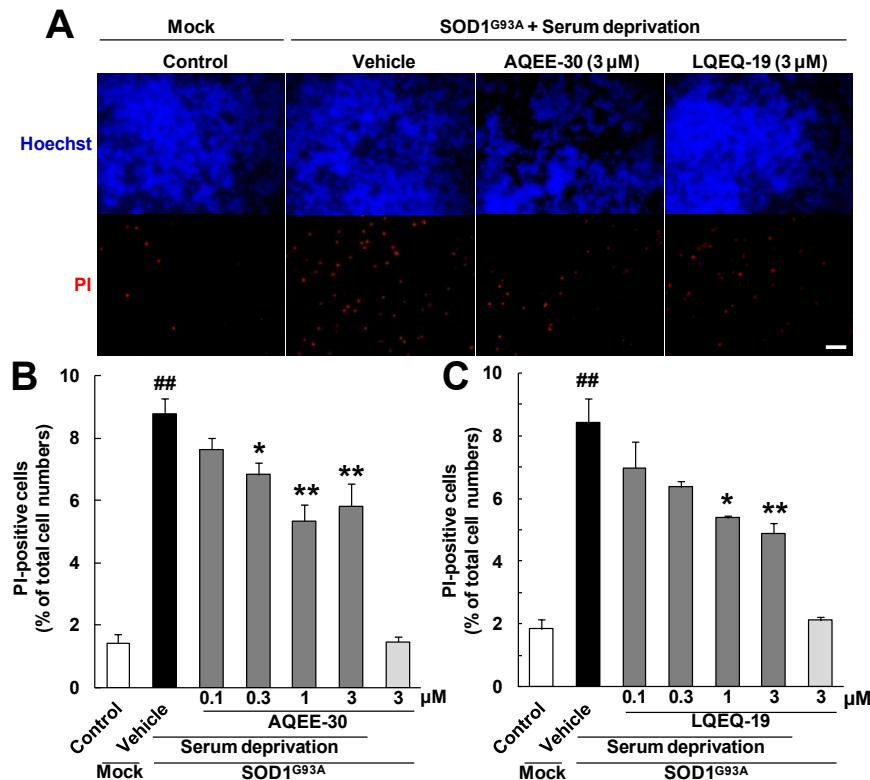


Figure 10. Effects of AQEE-30 and LQEQ-19 on the survival of NSC34 cells with mutated SOD1.

(A) Representative fluorescence microscopic images of nuclear staining. The scale bar represents 50 μ m. (B, C) The numbers of propidium iodide-positive cells were counted and the results are expressed as percentages of Hoechst 33342-positive cells. AQEE-30 and LQEQ-19 were added at 0.1–3 μ M. Values are means \pm SEM (n = 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs. the vehicle group (Dunnett's test). ## P < 0.01 vs. the control group (Student's t -test).

3-2 *In vitro* ALS モデルに対する TLQP-21 及び AQEE-11 の保護作用

AQEE-30 の N 末端に位置する生理活性ペプチドである TLQP-21 及び AQEE-30 の N 末端側 11 アミノ酸からなる AQEE-11 の細胞保護作用を検討した。全細胞数に対する PI 陽性細胞数を Fig. 11A, B に示した。Control 群に対して Vehicle 群では有意に死細胞率が増加していた (Fig. 11B)。TLQP-21 及び AQEE-11 を添加しても細胞死は抑制されず、細胞保護作用を示さなかった (Fig. 11B)。Fig. 10 の結果も踏まえ、VGF 由来ペプチドの保護作用は LQEQ-19 に由来するものであることが示唆された。

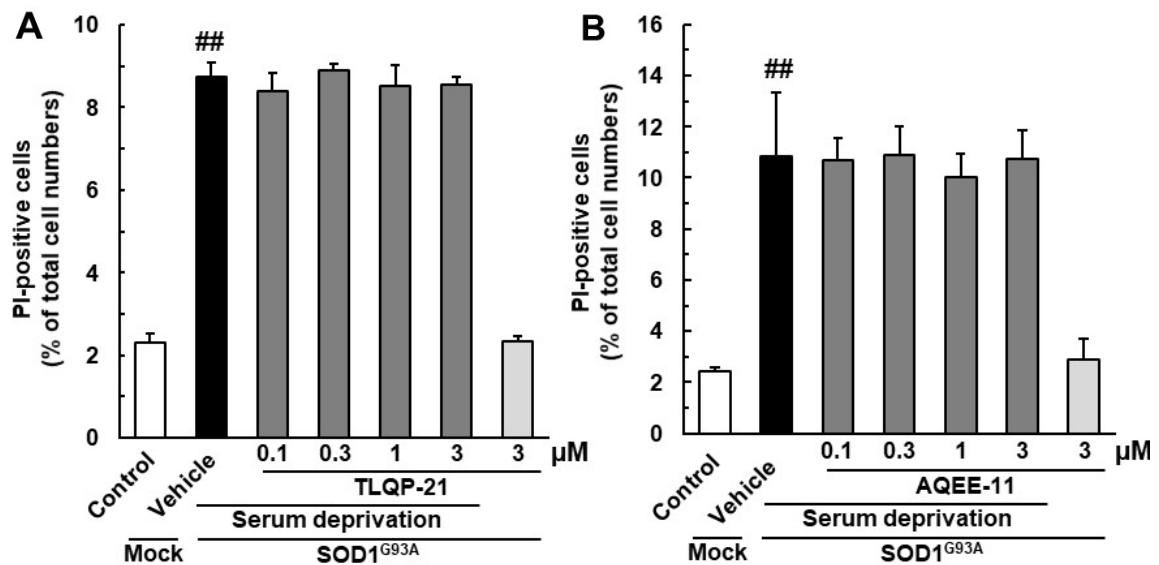


Figure 11. TLQP-21, AQEE-11 are not neuroprotective of NSC34 cells with mutated SOD1.

(A, B) The numbers of propidium iodide-positive NSC34 cells were counted and the results are expressed as percentages of Hoechst 33342-positive cells. The peptides were added at 0.1 to 3 μ M. Values are means \pm SEM ($n = 5$). ^{##} $P < 0.01$ vs. the control group (Student's t -test).

3-3 *In vitro* ALS モデルに対する QEEL-16、LENY-13 及び HVLL-7 の保護作用

神経細胞保護作用を有する最小の生理活性ペプチドを特定するため、LQEQ-19 の N 末端アミノ酸を短縮させたポリペプチドを作製し、神経保護作用の有無を検討した。使用したペプチドは QEEL-16、LENY-13 及び HVLL-7 であり、それぞれ LQEQ-19 の C 末端ペプチドである。全細胞数に対する PI 陽性細胞数を Fig. 12A-C に示した。検討したいずれのペプチドも細胞死を抑制せず、細胞保護作用を示さなかった (Fig. 12A-C)。

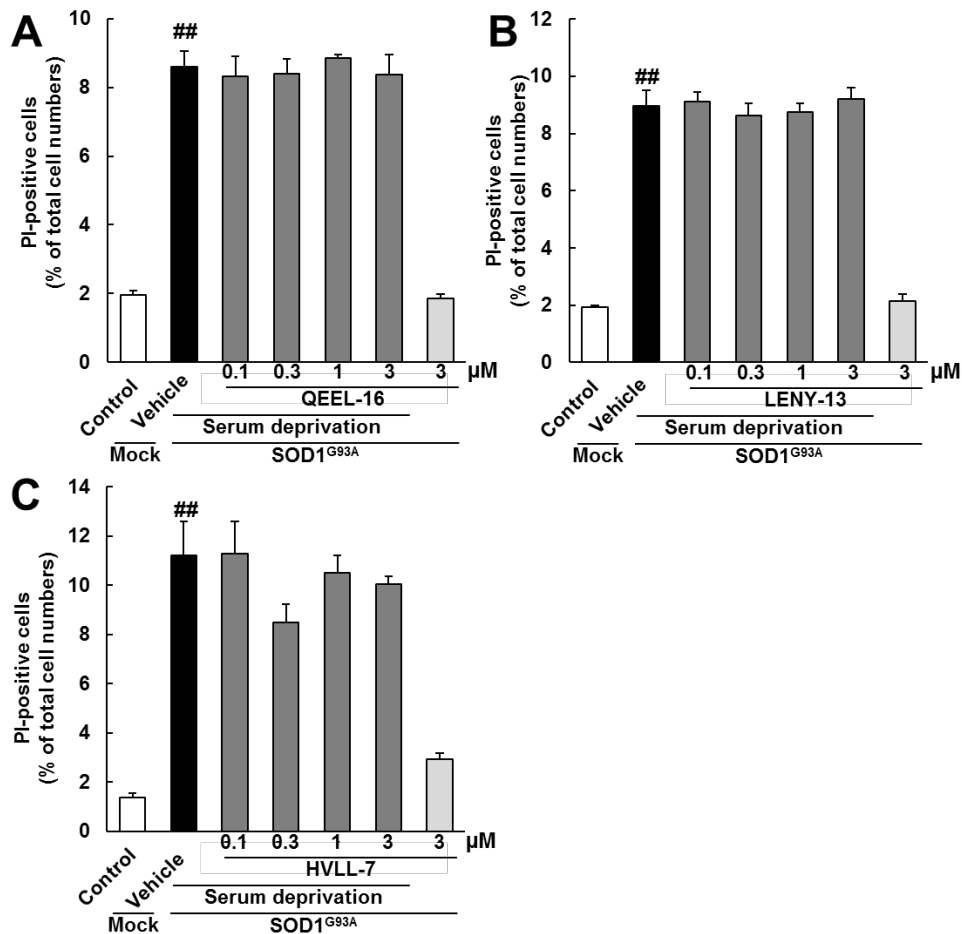


Figure 12. Shorter peptides derived from LQEQ-19 are not neuroprotective of NSC34 cells with mutated SOD1.

(A-C) The numbers of propidium iodide-positive NSC34 cells were counted and the results are expressed as percentages of Hoechst 33342-positive cells. The peptides were added at 0.1 to 3 μM. Values are means ± SEM (n = 5). ^{##}*P* < 0.01 vs. the control group (Student's *t*-test).

3-4 LQEQ-19 の生存シグナルに対する作用

LQEQ-19 は細胞保護作用を有する最小の生理活性ペプチドであることが示唆された。次はこれらの作用機序の検討を行った。生存シグナル関連分子である Akt 及び ERK1/2 のリン酸化レベルについて、ウェスタンブロット法を用いて検討した。Akt のリン酸化レベルは、LQEQ-19 を単独で処置した 1 時間後に有意に上昇し、ERK1/2 のリン酸化レベルは LQEQ-19 を単独で処置した 5 分後に有意に上昇した (Fig. 13A, B)。LQEQ-19 の細胞保護作用が Akt 経路及び ERK 経路を介していることを裏付けるため、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害薬 LY294002 及び Mitogen-activated protein kinase (MEK) 阻害薬 U0126 を用いて LQEQ-19 の細胞保護作用が阻害されるかを検討した。細胞数に対する PI 陽性細胞数を Fig. 13C に示した。LQEQ-19 による細胞保護作用は、PI3K 阻害薬 (20 μ M) 及び MEK 阻害薬 (0.1 μ M) の前処置で阻害された (Fig. 13C)。

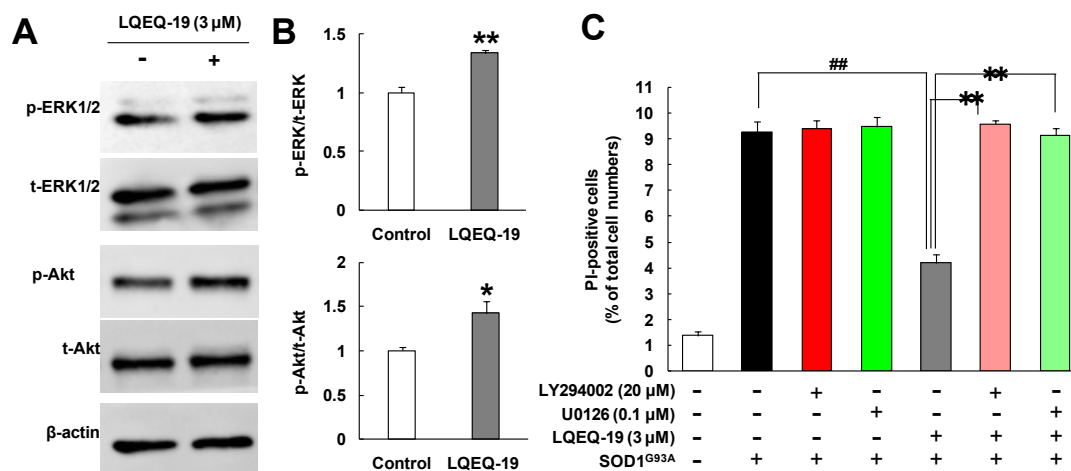


Figure 13. LQEQ-19 activates Akt and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 resulting in neuroprotection.

Changes in phospho (p)-Akt and p-ERK1/2 expression levels in NSC34 cells were assessed by western blotting. (A) Typical images showing immunoreactive bands of Akt, ERK1/2, and β-actin. (B) Quantitative analysis of p-Akt and p-ERK1/2. Each column represents the mean ± SEM (n = 3). **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 versus the control group (Student's *t*-test). (C) Evaluation of the effect of a phosphoinositide 3-kinase inhibitor (LY294002) and a MEK/ERK inhibitor (U0126) at final concentrations 20, 0.1 μM each other on the neuroprotection induced by 3 μM LQEQ-19. The numbers of PI-positive NSC34 cells were counted and are expressed as percentages of Hoechst 33342-positive cells. Values are means ± SEM (n = 5). ##*P* < 0.01 vs. control (Student's *t*-test), ***P* < 0.01 vs. SOD1^{G93A} NSC34 cells treated with LQEQ-19 (Tukey's test).

第4節 考察

本研究により、VGF 由来ペプチドである AQEE-30 及び LQEQ-19 は、濃度依存的に ALS 様細胞モデルに対して細胞保護作用を示すことを明らかにした。一方、その他の VGF ペプチド (QEEL-16、LENY-13、HVLL-7) は細胞保護作用を示さなかった (Figs. 10-13)。また、LQEQ-19 の細胞保護作用は、ERK 及び Akt 経路の活性化を介していることが示唆された。

既報において、ALS 患者及びモデルマウスの脳脊髄液、また血清及び線維芽細胞において VGF の発現量が減少していることが明らかにされている (23,26)。さらに、VGF 誘導薬 SUN N8075 は SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの運動機能の低下を抑制し、生存期間を延長させることを明らかにしている (27)。これらの結果は、VGF の発現が ALS 病態形成に関与していることを示唆している。しかし、VGF そのものが ALS 病態に対して、直接的な細胞保護効果を有するか否かについては不明であった。本検討により、VGF 由来ペプチドである AQEE-30 及び LQEQ-19 は、直接的な細胞保護作用を有することを明らかにした。

第1章の結果より、VGF 前駆体タンパク質の C 末端側のペプチドである AQEE-30 は、ハンチントン病モデル細胞に対して細胞保護作用を示すが、VGF 前駆体タンパク質の C 末端側を含まない TLQP-21 は細胞保護作用を示さなかった。本章で示した様に、ALS モデルに対する検討においても同様の結果が得られ、これらのペプチドは共通の作用を介して神経保護作用を示したことが示唆された。さらに、AQEE-30 の C 末端側ペプチドである LQEQ-19 についても細胞保護作用が認められた。このことより、VGF の C 末端ペプチドは細胞保護効果の発現に重要であることを示唆している。しかし、LQEQ-19 に関しては、生理活性に関する報告が少なく今後さらなる検討が必要である。

ラット脳より抽出した C 末端 VGF ペプチドには LQEQ-19 とともに、+1 残基

のペプチド(RLQE-20)、-2 残基のペプチド (EQEE-17) 及び 3 残基のペプチド (QEEL-16) が存在することが報告されている (12)。これらのペプチドについて、能動的に生成されているのか、活性を有しているのか等は未だ不明であり、LQEQ-19 よりも短い 2 ペプチドについてはエキソペプチダーゼにより LQEQ-19 が分解されて生じたものであると予想される。

LQEQ-19 の生理活性としては、感覚神経への作用による熱痛覚過敏が報告されており (63)、この作用は AQEE-30 にも共通している。しかしながら、AQEE-30 と LQEQ-19 の活性はほぼ同等であるが、作用発現及び持続時間に差があり、LQEQ-19 は作用発現が早く、作用の消失も早いことから (63)、LQEQ-19 は速やかに分解を受け活性を失う可能性が考えられる。以上より、EQEE-17 や QEEL-16 が仮に生理活性を有していたとしても、素早く代謝されてしまい、表現型として認められなかった可能性がある。

さらに、LQEQ-19 の細胞保護作用に関してその作用機序についても検討を行った。TLQP-62 は生存シグナル関連因子である Akt と ERK1/2 の活性化に関与すること、また LQEQ-19 は p-38 の活性化を制御することが報告されており、VGF ペプチドは MAP キナーゼの活性化に関与することが示唆されていた (63)。本検討では、LQEQ-19 の単独処置により生存シグナル関連分子である Akt のリン酸化レベルが試薬添加の 1 時間後に上昇し、ERK1/2 のリン酸化レベルが試薬添加の 5 分後に上昇した。さらに、PI3K 阻害薬及び MEK 阻害薬の添加により LQEQ-19 の細胞保護作用が阻害されたことから、LQEQ-19 の細胞保護作用は Akt 経路及び MEK/ERK 経路を介していることが示唆された。

VGF 由来ペプチドの作用点に関しては、TLQP-21 の受容体が報告されており、TLQP-21 は補体受容体 C3aR1 等との結合を介して、Phospholipase C γ (PLC γ) 及び Phospholipase A2 の脱リン酸化を誘導する (64)。さらに、TLQP-21 による受

容体の活性化は、 Ca^{2+} を小胞体から細胞内に放出させる (64)。VGF 由来ペプチドの神経保護作用は、これらの作用機序を介している可能性が考えられる。一方、LQEQ-19 が作用する受容体等については明らかになっていない。LQEQ-19 を ALS の治療に応用するためには、今後、ALS の病態における VGF の関与を明らかにし、作用点について更なる検討を行う必要がある。

第3章 ヒト脊髄における VGF 産生細胞の解明及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 病態における VGF 発現変化の検討

第1節 緒言

第2章において、VGF 由来ペプチドが *in vitro* ALS モデル細胞に対して保護作用を示すことを明らかにした。Brancia らは、孤発性 ALS の患者及び家族性 ALS モデル (変異 SOD1^{G93A}) マウスの脳脊髄液において、VGF 由来ペプチドの発現が減少していることを報告した(23)。また、この変異 SOD1^{G93A} マウスの脊髄組織における VGF タンパク質の発現は、運動機能の低下が検出される生後 90 日より早期の 75 日齢において低下している (26)。したがって、VGF の発現低下が発症に先行して低下し、それにより病態進行を促進させている可能性が考えられる。しかし、序論でも述べたように、ヒト VGF は 615 アミノ酸より構成され、N 末端 1-22 アミノ酸 に分泌シグナル配列を有する分泌型の前駆タンパク質であり (11)、この前駆タンパク質は Prohormoneconvertases 1/3 及び 2 (PC1/3, PC2) 等のプロテアーゼにより切断を受け、C 末端側の VGF 由来ペプチドである TLQP-62、TLQP-21、AQEE-30、LQEQ-19 を含む種々の生理活性ペプチドが産生される。したがって、C 末端 VGF 配列を認識する抗 VGF ペプチド抗体等を用いた免疫染色では、細胞外に分泌して広範に局在している VGF も検出してしまうことから、発現細胞を特定することは難しい。また、ALS 患者の脊髄前角における VGF の局在について、詳細に検討した報告は存在しない。したがって、ヒト ALS 患者脊髄における VGF 発現変化及びその局在について明らかにする必要がある。

本章では、ALS 患者及び対照非神経変性疾患患者由来の脊髄サンプルを用いて、脊髄における *VGF* mRNA 及び VGF タンパク質の局在、さらに ALS 病態下における発現変化を *in situ* hybridization 法及び免疫染色法を用いて検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。エタノール (Ethanol)、キシレン (Xylene)、塩化カリウム (Potassium chloride; KCl)、塩化ナトリウム (Sodium chloride; NaCl) は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム (Potassium dihydrogenphosphate; KH_2PO_4)、リン酸水素二ナトリウム・十二水 (Sodium hydrogenphosphate 12-water; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、Horse serum (#S-2000, Lot: ZA0414) は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、RNAscope[®] 2.5 HD Detection Kit、human VGF Probe (RNAscope[®] Probe-Hs-VGF; Cat # 466111)、Negative control probe (RNAscope[®] Negative Control Probe-DapB; Cat #310043) は Bio-technique (MN, USA)、Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (#A11030, Lot: 1736960, RRID AB_2534089)、Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (#A21204, Lot: 1366500, RRID AB_1500750)、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (#A11008, Lot: 1672238, RRID AB_143165) は Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)、Mouse anti-neurofilament H non-phosphorylated monoclonal antibody (SMI-32) (#NE1023, Lot: D00168792, RRID AB_2043449) は Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)、Rabbit anti-VGF polyclonal antibody (Cat #ab69989, Lot GR130693-3) は Abcam (Cambridge, UK)、DAPI (#40043, Lot: 10D1005-69115) は Biotium (Hayward, CA, USA)、フルオロマウント (fluoromount) は Diagnostic BioSystems (Pleasanton, CA, USA) よりそれぞれ購入した。PBS (Phosphate buffered saline) は、KCl、 KH_2PO_4 、NaCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を超純水 (MilliQ) に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 生命倫理

本試験は、ヘルシンキ宣言 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>) を遵守して実施した。本研究は新潟大学脳研究所で「病理解剖並びに病理検体保存とその使用に関する承諾」が得られている症例を用い、新潟大学医学部倫理委員会の承認 (承認番号: 2523) 及び岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認 (承認番号: 岐阜市薬会第 334 号) を得た上で行った。患者に本試験の目的を説明し、書面による同意 (インフォームドコンセント) を得た。患者自身が同意することができない場合は、家族または親族からの同意を得た。本検討で使ったのは、全て剖検サンプルである。脊髄組織を摘出及び切片の作製は新潟大学脳研究所において行った。

2-2-2 ALS 患者及び対照患者の脊髄パラフィン組織切片作製

対照非神経変性疾患患者 9 名 (年齢: 69.8 ± 4.6 歳)、改訂版 El Escorial 診断基準 (65) を満たした孤発性 ALS 患者 9 名 (年齢: 70.9 ± 2.7 歳) 及び長期生存孤発性 ALS 患者 3 名 (年齢: 76.3 ± 2.3 歳) について検討を行った (Table 1)。死後 6 時間以内に脊髄を摘出し、約 4 週間、20%緩衝ホルマリンに浸した。腰髄、胸髄、頸髄に切断した上でパラフィン包埋処理を行い、切片作製までの間、新潟大学脳研究所において保管した。新潟大学脳研究所で、厚さ $4 \mu\text{m}$ の冠状断面切片を作製し、MAS コーティング (親水性剥離防止コーティング) されたスライドガラス (Matsunami Glass Ind. Ltd., Osaka, Japan) に載せた。作製した切片は、新潟大学脳研究所から岐阜薬科大学薬効解析学研究室に輸送した後、*in situ* hybridization 及び免疫染色を行った。

Table 1. Spinal cords from patients with sporadic ALS or other diseases.

Characteristic	Control	ALS patients	Long term survival ALS patients
Patients (n)	9	9	3
Male (n)	6	8	3
Female (n)	3	1	0
Age (years)	69.8 ± 4.6	70.9 ± 2.7	76.3 ± 2.3

Age data are presented as mean ± S.E.M. Spinal cord samples were acquired from nine patients with sporadic ALS, three ALS patients with long-term survival, and nine patients with other diseases.

2-2-3 *In situ* hybridization

RNAscope® 2.5 HD Detection Kit の製品プロトコールに従って実施した。パラフィン切片を 60°C で 1 時間乾燥させ、キシレン (5 分、2 回)、100%エタノール (2 分、1 回)、に浸し脱パラフィンを行った後 5 分間風乾させた。各切片に過酸化水素水を十分に浸漬するよう滴下し、室温で 10 分反応させた後、蒸留水で 2 回洗浄した。100°C に加熱した 1×Target Retrieval solution にスライドを 15 分浸し、蒸留水で 2 回、100%エタノールで 1 回洗浄した後風乾させた。各切片に Protease Plus を十分に浸漬するよう滴下し、40°C で 30 分インキュベートした後、蒸留水で 2 回洗浄した。RNA プローブとして Human *VGF* Probe または Negative control siRNA を使用した。各プローブを組織に滴下後、湿潤条件下で 40°C で 2 時間インキュベートし、1×Wash Buffer を用いて洗浄した (2 分、2 回)。続いて湿潤条件下でシグナル増強試薬 Amp1 (40°C、30 分)、Amp2 (40°C、15 分)、Amp3 (40°C、30 分)、Amp4 (40°C、15 分)、Amp5 (室温、30 分)、Amp6 (室温、15 分) を順に反応させ、各インキュベーションの後には 1×Wash Buffer を用いて洗浄を行った (2 分、2 回)。発色基質の RED solution (RED-A:RED-B = 60:1) を使用直前に調製し、各切片に滴下して室温で 10 分インキュベートした後蒸留水で 3 回洗浄した。DAPI を滅菌蒸留水で 1,000 倍希釈した後、室温で 10 分インキュベートし、核染

色を行った。PBS で洗浄 (5 分、3 回) した後、フルオロマウントで封入した。撮影はレーザー共焦点顕微鏡 (FV10i; Olympus) を用いて行った。

2-2-4 免疫染色

パラフィン切片をキシレン (15 分、3 回)、無水エタノール (10 秒、2 回)、99% エタノール (10 秒、2 回)、90%エタノール (10 秒、1 回)、70%エタノール (10 秒、1 回)、蒸留水 (10 秒) の順に浸漬し、脱パラフィンを行った。抗原賦活化処理として、切片を pH 6.2 のクエン酸緩衝液 (クエン酸及びクエン酸ナトリウムを超純水に溶かして作製) に浸漬し、120°C で 15 分オートクレーブを実施した。室温に戻し、PBS で洗浄 (5 分、2 回) した後、10% Horse serum PBS (室温、1 時間) を用いてブロッキングを行った。NFH 及び VGF の 2 重免疫染色の際には、PBS で洗浄 (5 分、2 回) した後、一次抗体として Anti-neurofilament H non-phosphorylated (1/1,000、4°C、一晚)及び Anti-VGF polyclonal antibody (1/500、4°C、一晚)を使用した。PBS で洗浄 (5 分、2 回) した後、二次抗体として Alexa Fluor 546-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (1/1,000、室温、1 時間) 及び Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1/1,000、室温、1 時間) を反応させた。同一切片で *in situ* hybridization と免疫染色を同時に実施した際には、2-2-3 の方法に従って RED solution の反応及び洗浄までを行い、ブロッキング以降の操作を行った。一次抗体として Anti-VGF polyclonal antibody (1/500、4°C、一晚) を、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouseIgG antibody (1/1,000、室温、1 時間) を反応させた。いずれのプロトコールにおいても、二次抗体反応後に PBS で洗浄 (5 分、3 回) し、DAPI を滅菌蒸留水で 1,000 倍希釈した後、室温で 10 分インキュベートし、核染色を行った。PBS で洗浄 (5 分、3 回) した後、フルオロマウントで封入した。撮影はレーザー共焦点顕微鏡

(FV10i; Olympus) を用いて行った。

2-2-6 観察方法

ALS 患者及び対照疾患患者の腰髄、胸髄、頸髄 (Fig. 14A) それぞれにおいて、Fig. 14B の赤い四角で示した部位について撮影を行った。Figs. 15、16 及び 18 において、解析ソフト Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて、盲検下で全細胞数に対する VGF 陽性細胞数を測定した。

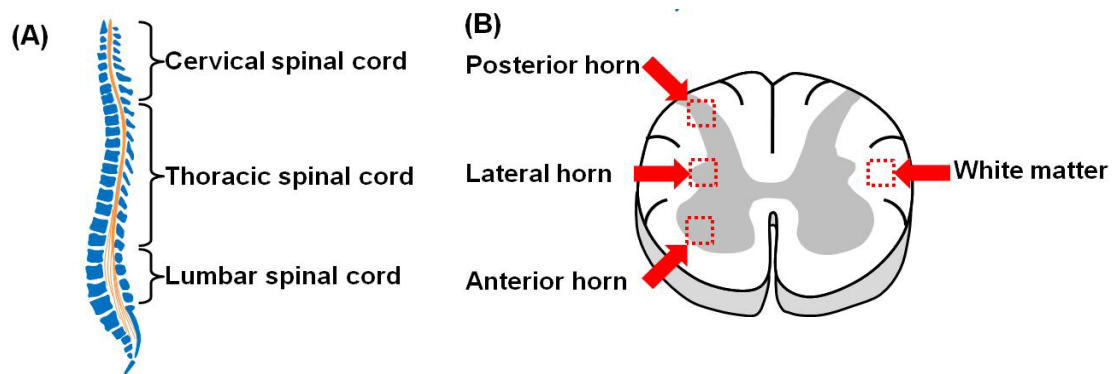


Figure 14. The schematic image of human spinal cord.

(A) Upper is an illustration of the spinal cord. We evaluated the lumbar, thoracic, and cervical spinal cord. (B) Lower is a sectional view, and red squares show the analyzed regions. Anterior horn of the gray matter and the white matter were mainly evaluated.

2-2-6 統計学的解析

実験成績は、平均値±標準誤差で示した。統計学的な比較は、Student's *t*-test により行った。危険率が 5%未満の場合を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 ALS 患者頸髄における *VGF* mRNA の局在

正常脊髄における *VGF* 産生部位及び ALS 病態下における *VGF* の発現変化について検討するため、対照非神経変性疾患患者及び孤発性 ALS 患者脊髄サンプルを用いて *in situ* hybridization を実施した (Fig 15)。正常頸髄において、*VGF* mRNA は脊髄前角、側角及び後角に局在していた (Fig. 15A, B)。また、白質への分布はほとんど認められなかった (Fig. 15A, B)。一方、ALS 患者脊髄前角において、対照群と比較して *VGF* mRNA のシグナルが低下し、陽性細胞数は有意に減少していた (Fig. 15C)。

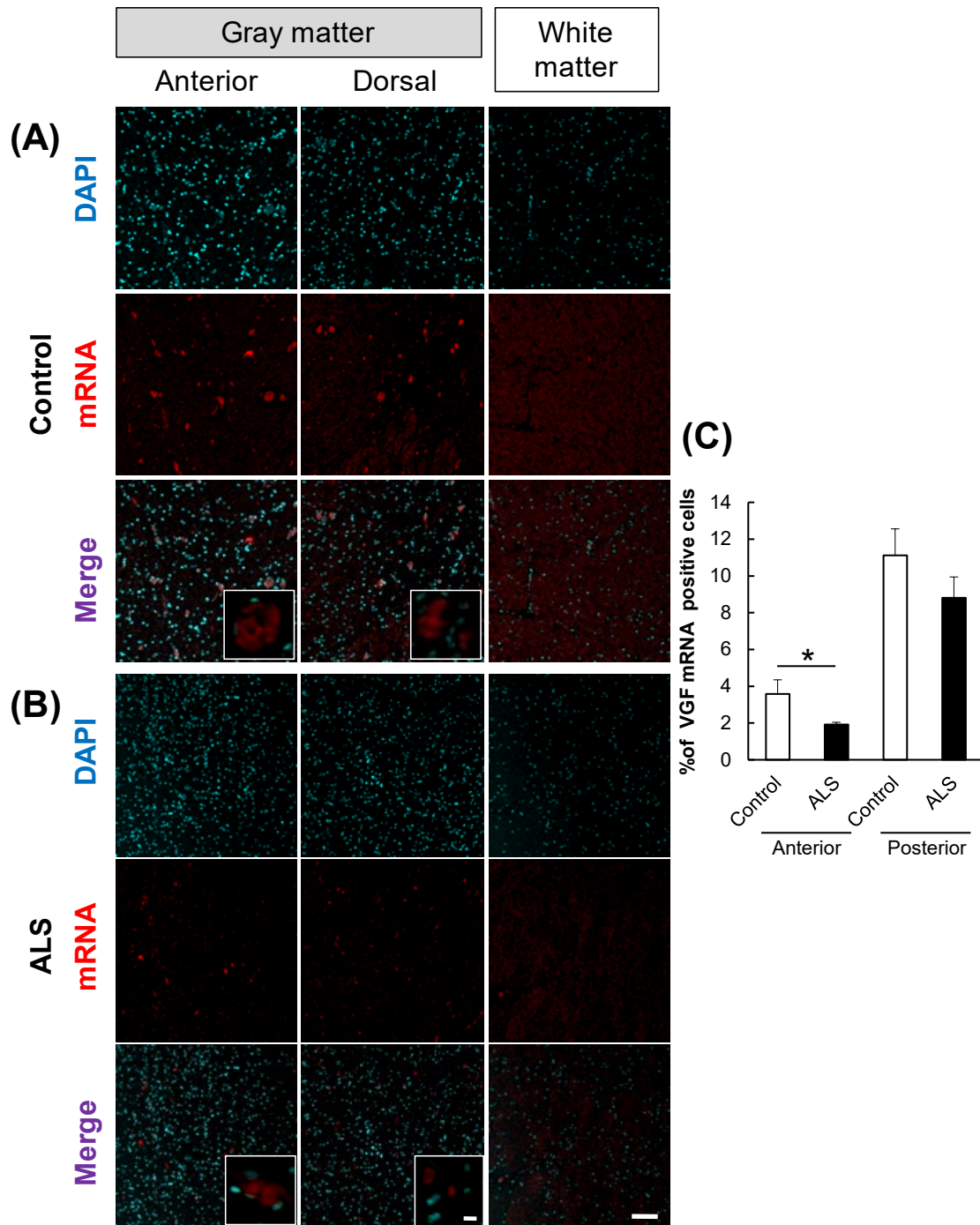


Figure 15. The localization of *VGF* mRNA in the human cervical spinal cord.

Representative images of *in situ* hybridization using RNA probe of human *VGF*. The upper images (A) represent the results of control patients and the lower images (B) represent the results of sporadic ALS patients for gray matter of the anterior horn and white matter in the cervical spinal cord. Scale bars in normal and high magnified images represent 100 or 10 μ m, respectively. (C) *VGF* mRNA-positive neuron in anterior and posterior horns, which localized in motor neuron and sensor neuron, respectively, were quantified.

3-2 ALS 患者腰髄における *VGF* mRNA の局在

In situ hybridization を用いて、腰髄における *VGF* mRNA の発現を検討した (Fig. 16)。頸髄の結果と同様に、*VGF* mRNA は脊髄前角及び脊髄後角に局在していた (Figs. 16A, B)。ALS 患者脊髄前角において、対照群と比較して mRNA のシグナルが低下し、陽性細胞数は有意に減少していた (Fig. 16C)。同様の傾向が胸髄の観察でも見られたが、運動神経細胞が集中している頸髄及び腰髄と比較して運動神経細胞が少なく、細胞体も小さいため、以降の検討では頸髄及び腰髄について検討を行うこととした。

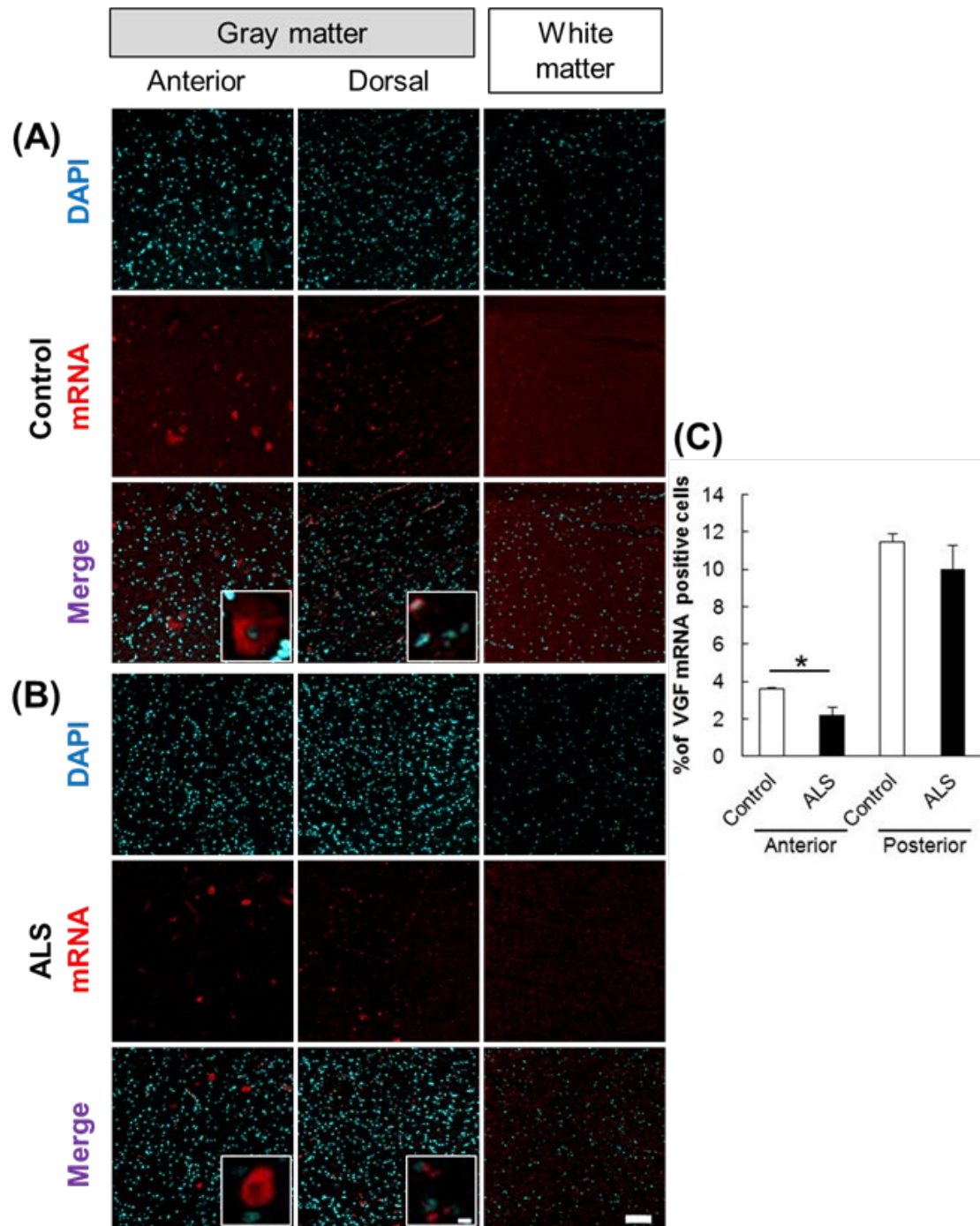


Figure 16. The localization of *VGF* mRNA in the human lumbar spinal cord.

Representative images of *in situ* hybridization using RNA probe of human *VGF*. The upper images (A) represent the results of control patients and the lower images (B) represent the results of sporadic ALS patients for gray matter of the anterior horn and white matter in the lumbar spinal cord. Scale bars in normal and high magnified images represent 100 or 10 μ m, respectively. (C) *VGF* mRNA-positive neuron in anterior and posterior horns, which localized in motor neuron and sensor neuron, respectively, were quantified.

3-3 脊髓前角及び後角における *VGF* mRNA の局在

高いシグナルが観察された頸髄及び腰髄について、感覚神経が分布する脊髓後角及び運動神経が分布する脊髓前角における *VGF* mRNA の局在を位相差像と対比してより詳細に観察した。脊髓後角において *VGF* mRNA は、頸髄及び腰髄ともに正常対照と ALS 患者間に明らかな発現量の差は認められなかった。また、脊髓前角において ALS 患者では *VGF* mRNA の発現量が低下していた。脊髓前角では、一つ一つのシグナルが大きく、比較的大きな細胞である運動神経細胞に局在していた (Fig. 17)。

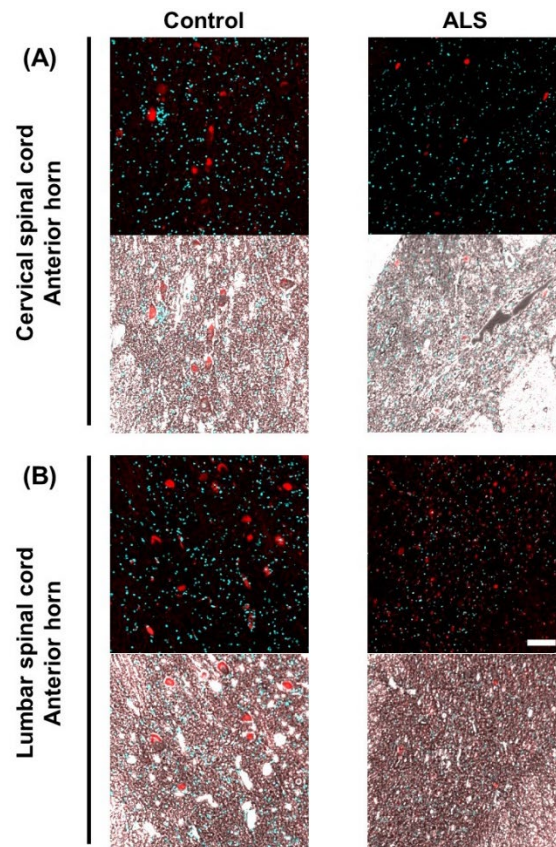


Figure 17. The localization of *VGF* mRNA in the human spinal cord.

Representative images of *in situ* hybridization using RNA probe of human *VGF* in the gray matter of the anterior horn. The upper images (A) represent the results of the cervical spinal cord and the lower images (B) represent the results of the lumbar cord. In this figure, we show overlaid fluorescence and phase contrast images to observe the localization of *VGF* mRNA in detail. Scale bar = 100 μ m.

3-4 VGF 産生細胞の同定及び ALS 病態における発現変化

Fig.17 の結果より、VGF 産生細胞が運動神経細胞であることが示唆された。そこで、運動神経細胞マーカーである抗 Neurofilament heavy (NFH) 抗体を用いた免疫染色と *in situ* hybridization を同時に行い、VGF mRNA の局在を確認した (Fig. 18A, C)。NFH 陽性かつ VGF mRNA 陽性細胞数を計測した結果、ALS 患者の頸髄及び腰髄前角において VGF 発現細胞が減少していた (Fig. 18B, D)。

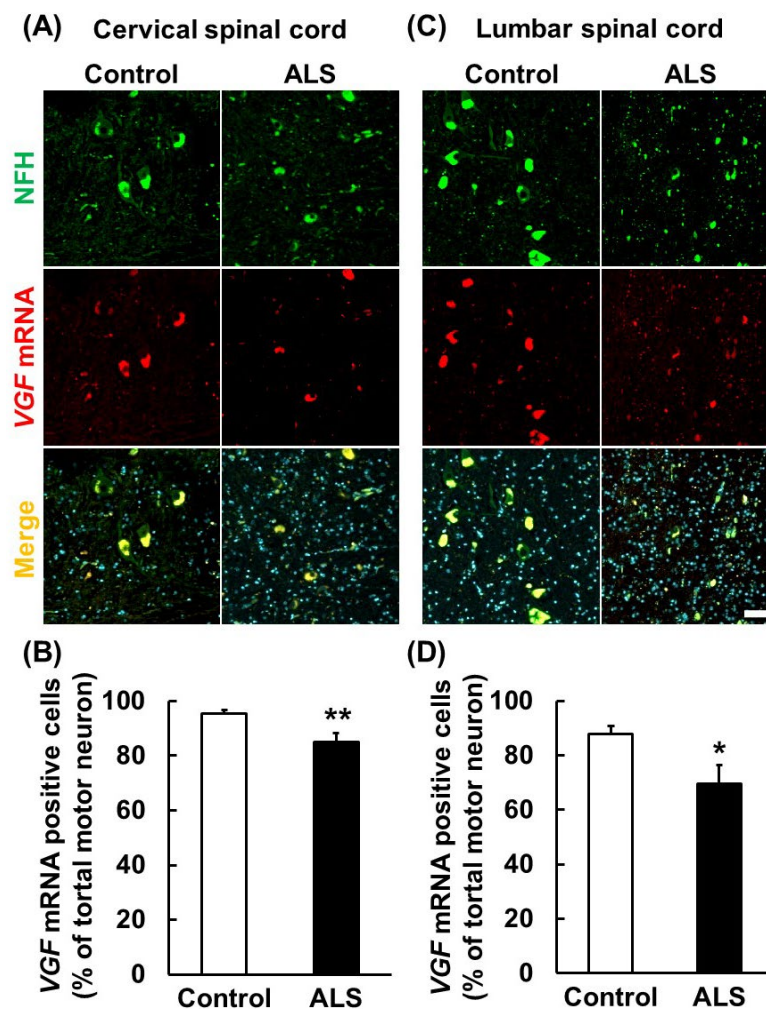


Figure 18. VGF mRNA was localized in motor neurons.

The upper images represent the results of *in situ* hybridization and immunohistochemistry in the cervical and lumbar spinal cord. The lower graphs represent VGF-positive cell number of NFH-positive motor neurons. Values are given as mean \pm S.E.M. ($n = 9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control group (Student *t*-test). Scale bar = 50 μ m.

3-5 ALS 患者脊髄における VGF タンパク質の局在

これまでの検討により、VGF は脊髄後角及び前角の運動神経細胞で産生され、ALS 病態において *VGF* mRNA 陽性の運動神経細胞が減少していた。そこで、*VGF* mRNA の発現変化がタンパク質レベルで反映されているか、また VGF タンパク質がどのような局在を示すのかを免疫染色法を用いて検討した。対照群では、ほぼすべての運動神経が VGF 陽性であり、*VGF* mRNA とほぼ同じ局在を示した。また、運動神経の周囲においても全体的に高い発現が認められた。一方、ALS 患者頸髄においては VGF 陰性の運動神経細胞が認められ、特に運動神経周囲において VGF 発現量が低下していた。さらに、ALS 長期生存例では残存運動神経において VGF の高い発現が認められた。また、通常の ALS 患者と比較して、運動神経の周囲に発現する VGF が多い傾向にあった。一方、脊髄後角及び白質において、対照群、ALS 患者及び長期生存例間で VGF の発現に明らかな違いは認められなかった (Fig. 19)。

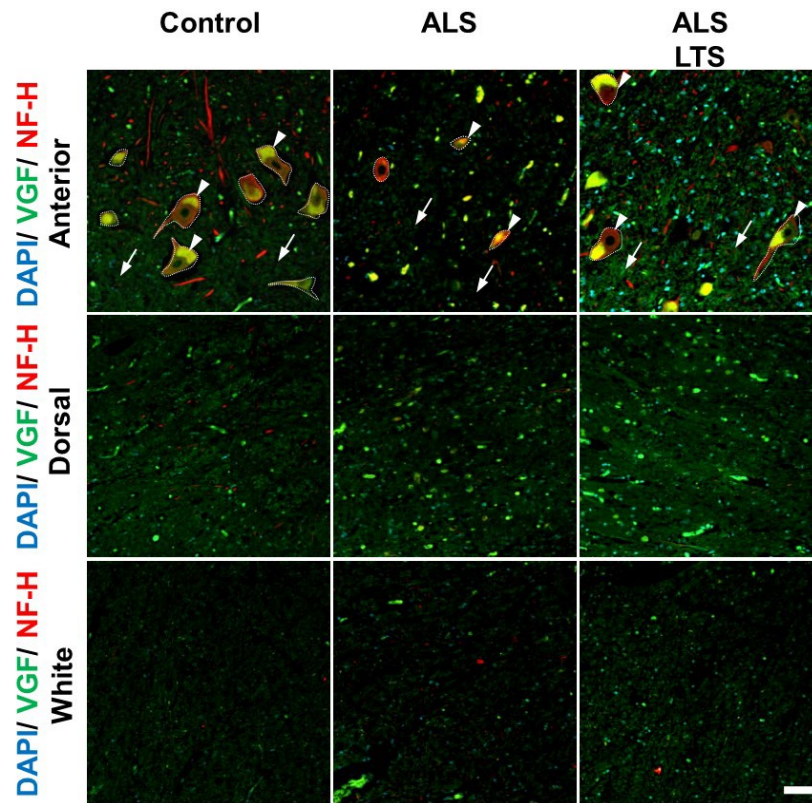


Figure 19. VGF protein localized in motor neurons and decreased in spinal cords of ALS patients.

The images represent the results of double immunostaining using VGF and NFH antibodies. We observed VGF expression in the anterior and dorsal horns in gray matter and white matter using controls, sporadic ALS patients, and long-term survival sporadic ALS patients. Scale bar = 50 μ m. Arrows and arrow heads represent intracellular and extracellular areas of motor neurons, respectively. The dotted line represents the profile line of motor neurons. Arrow heads and arrows show intracellular and extracellular areas, respectively.

第4節 考察

本研究の結果より、VGFは脊髄前角の主に運動神経細胞で産生されていることが明らかになった。さらに、VGF陽性細胞内及び細胞外のVGFは、ALS患者脊髄前角において減少していることを明らかにした。ALS患者及びモデルマウスの脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid: CSF) 及び血清でVGFが減少すること並びにSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスでは加齢とともにVGFの発現量が低下することが報告されている(23,26)。さらに、VGF過剰発現によりSOD1^{G93A}マウス由来の初代培養運動神経は、NMDAや α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 誘発の毒性に対して耐性を獲得する(26)。これらの知見より、VGFとALSの進行には密接な関係が示唆されていたが、脊髄組織またはCSFにおけるVGFの供給源及びALS病態でVGFが減少する原因は不明であった。過去の質量分析法を用いた検討において、全長VGF及びC末端側ペプチドNAPP-129 (VGF₄₈₅₋₆₁₅) がマウス頸髄組織に高発現している(23)。切断を受けていないまたは比較的高分子量のVGF由来ペプチドが存在することから、CSF中に存在するVGFは異所性に分泌されたものではなく、脊髄より分泌されたものであることが考えられる。脊髄におけるVGFの産生については、感覚神経についてのみ詳細な検討が行われており、Spared nerve injury (SNI) モデルにおいて、脊髄後根の感覚神経C線維でVGFの発現量が増加する(66)。

本研究において、ALS患者脊髄後角ではVGFの発現量は、コントロールとして用いた対照非神経変性疾患患者と明らかな差が認められないことから、ALS病態下でのVGFの減少に対して感覚神経におけるVGF産生の変化は寄与しないことが示唆された。運動神経細胞含む脊髄前角において、VGF mRNAは運動神経細胞マーカーであるNFH陽性細胞と共局在していた。これらのことより、脊髄前角においてVGFは主に運動神経細胞で産生されていることが考えられる。

また、ALS 患者では *VGF* mRNA 陽性運動神経細胞数が減少していた。しかしながら、ALS 患者における *VGF* mRNA 陽性運動神経細胞の減少は比較的軽度であり、*VGF* タンパク質陽性運動神経細胞についても同様の傾向が見られた。一方で、運動神経細胞周囲における *VGF* タンパク質の免疫反応性は、ALS 患者において著明に減少していた。これに対して、長期生存 ALS 患者の脊髄において、運動神経細胞外の *VGF* 発現量は低下しておらず、対照非神経変性疾患患者とほぼ同程度であった。*VGF* は小胞形成を補助し、神経伝達物質等の分泌を制御する Chromogranin B (CgB) と相互作用することが明らかにされており、ALS 病態では CgB の発現量が減少し、局在異常が起こることが報告されている (67, 68)。これらのことより、ALS 病態下では運動神経細胞からの *VGF* 分泌が低下し、これにより CSF 及び脊髄組織における *VGF* の発現量が減少していることが示唆された。

1 章及び 2 章の検討結果より、細胞外より作用させた *VGF* 由来ペプチドが神経保護作用を示すことを明らかにした。これより、細胞外 *VGF* の減少している ALS 病態下では *VGF* の神経保護作用は正常に発揮されず、その結果として病態が進行する可能性が考えられる。過去の検討において、*VGF* の発現量を増加させる薬物が複数同定されており、治療応用の可能性が考えられている (27)。しかしながら、本検討の結果より、*VGF* の発現量を増加させたとしても、細胞外への分泌が正常に起こらなければ十分な効果が得られない可能性がある。この問題を解決するために、神経保護作用を有する *VGF* ペプチドを CSF 中に補充することが考えられるが、ペプチドの半減期や主たる病巣である脊髄前角までの送達という障害があるため、最終的には受容体等の *VGF* ペプチドの作用点を明らかにし、その作用点を標的とした低分子化合物などの創出を行う必要があると考える。

以上、本章において VGF が主にヒト脊髄運動神経細胞から産生され、ALS 患者においてその発現が減少していることを明らかにした。これらの結果は、VGF が ALS の新規治療ターゲットとなりうることを示唆している。

総括及び結論

神経変性疾患は、中枢神経の特定の神経細胞群が進行性に変性・脱落する疾患群であり、Huntingtin の変異により線条体神経細胞が脱落するハンチントン病や、上位及び下位運動神経細胞が障害される筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 等からなる。神経変性疾患は、特定のタンパク質の機能喪失及び獲得、構造異常や異常蓄積等が生じることが知られているが、いずれの疾患も根本的な原因や進行過程等に不明な点が多く、根治には至っていない。ALS 患者において、分泌ポリペプチド VGF の発現が変化することに加えて、VGF が切断されて生じるペプチドの中には軸索の伸長作用や細胞死の抑制作用を有するものが存在することが報告されている。

本研究では、代表的な神経変性疾患であるハンチントン病及び ALS 病態における VGF の関与並びにその神経保護作用を明らかにすることを目的として研究を実施した。

第 1 章では、VGF 及び VGF 誘導薬及び VGF ペプチドのハンチントン病に対する保護作用を検討した。

1. mHtt 誘発細胞死に対して、VGF 誘導作用を有する SUN N8075 は保護作用を示し、VGF の発現量を上昇させた。
2. SUN N8075 はハンチントン病モデル細胞において、生存シグナル関連因子である ERK1/2 の活性化を誘導し、同因子の阻害は SUN N8075 の細胞保護作用を減弱させた。
3. VGF 由来ペプチド AQEE-30 は、mHtt 誘発細胞死に対して保護作用を示した。
4. SUN N8075 及び AQEE-30 は、mHtt の凝集を抑制した。
5. SUN N8075 はハンチントン病モデルマウスの発症を遅延させ、線条体神経細

胞死を抑制した。

第2章では、運動神経様細胞株である NSC-34 に家族性 ALS の原因遺伝子の一つである変異 SOD1^{G93A} を導入した *in vitro* ALS モデルを用いて VGF ペプチドの神経保護作用を検討し、創薬への可能性を考慮して当該ペプチドの最小化を試みた。

1. SOD1^{G93A} 誘発 NSC-34 細胞死に対して、VGF 由来ペプチド AQEE-30 及び LQEQ-19 は濃度依存的な保護作用を示した。
2. TLQP-21、AQEE-11 等の LQEQ-19 より N 末端側のペプチド及び QEEL-16、LENY-13、HVLL-7 等の LQEQ-19 の N 末端側が短縮されたペプチドは細胞保護作用を示さなかった。
3. LQEQ-19 は Akt 及び ERK1/2 の活性化を引き起こし、PI3K 阻害薬及び MEK 阻害薬はそれぞれ LQEQ-19 の細胞保護作用を抑制した。

第3章では、孤発性 ALS 患者及び対照非神経変性疾患患者由来の脊髄サンプルを用いて、脊髄における VGF の局在及び病態下での発現変化を検討した。

1. ヒト頸髄及び腰髄において *VGF* mRNA は脊髄前角及び後角に発現し、ALS 病態において運動神経が局在する前角で発現量が減少した。
2. ヒト脊髄前角において、*VGF* mRNA は運動神経に発現しており、ALS 病態においては *VGF* 陰性の運動神経が増加した。
3. ALS 病態において、脊髄前角の VGF タンパク質の発現は減少傾向にあるが、長期生存 ALS 患者においては VGF の発現が維持されていた。

本研究より、VGF 由来ペプチドはハンチントン病や ALS 等の発症原因や障害

される細胞種の異なる神経変性疾患に対して、保護作用を有していた。また、この細胞保護作用を有する VGF 由来ペプチドとして AQEE-30 及び LQEQ-19 を同定し、この細胞保護作用が ERK1/2 経路及び Akt 経路の活性化を介したものであった。SOD1^{G93A} 誘発の細胞障害に対して神経保護作用を有する VGF ペプチドとしては、LQEQ-19 が最小であった。さらに、ALS の主たる病変部位である脊髄前角において、VGF は主に運動神経において産生され、ALS 病態ではその発現量が減少することを明らかにした。

以上の結果より、VGF 由来ペプチドは、ハンチントン病や ALS をはじめとする神経変性疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御助言を賜りました薬効解析学研究室准教授嶋澤雅光博士及び助教中村信介博士に深謝致します。また、諸種のご協力をいただきました薬効解析学研究室諸氏に心から感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物動態学研究室教授北市清幸博士、岐阜薬科大学グローバルレギュラトリーサイエンス教授塚本桂博士並びに岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室准教授位田雅俊博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御支援並びに実験材料の御提供を賜りました新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野教授柿田明美博士並びに新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野諸氏に心から感謝の意を表します。

最後に、本研究の趣旨に賛同しご協力下さいました ALS 患者様及び御家族の皆様に深く感謝致します。

本研究の一部は新潟大学脳所共同研究費補助金の助成 (2016-2523, 2017-2523, 2018-2523) によって行われました。本研究において開示すべき利益相反 (Conflict of interest; COI) はありません。

引用文献

1. Derouesne, C. (2008) [Alzheimer and Alzheimer's disease: the present enlightened by the past. An historical approach]. *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement* **6**, 115-128.
2. Lashley, T., Rohrer, J. D., Mead, S., and Revesz, T. (2015) Review: an update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations. *Neuropathology and applied neurobiology* **41**, 858-881.
3. Rubinsztein, D. C. (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* **18**, 202-209.
4. Stefanova, N., and Wenning, G. K. (2016) Review: Multiple system atrophy: emerging targets for interventional therapies. *Neuropathology and applied neurobiology* **42**, 20-32.
5. Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2002) Amino acid determinants of alpha-synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle. *FEBS letters* **522**, 9-13.
6. Wijesekera, L. C., and Leigh, P. N. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases* **4**, 3.
7. Soto, C., and Pritzkow, S. (2018) Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience* **21**, 1332-1340.
8. Bartus, R. T., and Johnson, E. M., Jr. (2017) Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? *Neurobiology of disease* **97**, 156-168.
9. Bartus, R. T., and Johnson, E. M., Jr. (2017) Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 2: Where do we stand and where must we go next? *Neurobiology of disease* **97**, 169-178.
10. Levi, A., Eldridge, J. D., and Paterson, B. M. (1985) Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science (New York, N.Y)* **229**, 393-395.
11. Garcia, A. L., Han, S. K., Janssen, W. G., Khaing, Z. Z., Ito, T., Glucksman, M. J., Benson, D. L., and Salton, S. R. (2005) A prohormone convertase cleavage site within a predicted alpha-helix mediates sorting of the neuronal and

- endocrine polypeptide VGF into the regulated secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* **280**, 41595-41608.
12. Trani, E., Giorgi, A., Canu, N., Amadoro, G., Rinaldi, A. M., Halban, P. A., Ferri, G. L., Possenti, R., Schinina, M. E., and Levi, A. (2002) Isolation and characterization of VGF peptides in rat brain. Role of PC1/3 and PC2 in the maturation of VGF precursor. *Journal of neurochemistry* **81**, 565-574.
 13. Possenti, R., Eldridge, J. D., Paterson, B. M., Grasso, A., and Levi, A. (1989) A protein induced by NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released through the regulated pathway. *The EMBO journal* **8**, 2217-2223.
 14. Yamaguchi, H., Sasaki, K., Satomi, Y., Shimbara, T., Kageyama, H., Mondal, M. S., Toshinai, K., Date, Y., Gonzalez, L. J., Shioda, S., Takao, T., Nakazato, M., and Minamino, N. (2007) Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* **282**, 26354-26360.
 15. Alder, J., Thakker-Varia, S., Bangasser, D. A., Kuroiwa, M., Plummer, M. R., Shors, T. J., and Black, I. B. (2003) Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* **23**, 10800-10808.
 16. Cattaneo, A., Sesta, A., Calabrese, F., Nielsen, G., Riva, M. A., and Gennarelli, M. (2010) The expression of VGF is reduced in leukocytes of depressed patients and it is restored by effective antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1423-1428.
 17. Thakker-Varia, S., and Alder, J. (2009) Neuropeptides in depression: role of VGF. *Behavioural brain research* **197**, 262-278.
 18. Moin, A. S., Yamaguchi, H., Rhee, M., Kim, J. W., Toshinai, K., Waise, T. M., Naznin, F., Matsuo, T., Sasaki, K., Minamino, N., Yoon, K. H., and Nakazato, M. (2012) Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion in vivo and in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **428**, 512-517.
 19. Levi, A., Ferri, G. L., Watson, E., Possenti, R., and Salton, S. R. (2004) Processing, distribution, and function of VGF, a neuronal and endocrine peptide

- precursor. *Cellular and molecular neurobiology* **24**, 517-533.
20. Salton, S. R., Fischberg, D. J., and Dong, K. W. (1991) Structure of the gene encoding VGF, a nervous system-specific mRNA that is rapidly and selectively induced by nerve growth factor in PC12 cells. *Molecular and cellular biology* **11**, 2335-2349.
 21. Snyder, S. E., Cheng, H. W., Murray, K. D., Isackson, P. J., McNeill, T. H., and Salton, S. R. (1998) The messenger RNA encoding VGF, a neuronal peptide precursor, is rapidly regulated in the rat central nervous system by neuronal activity, seizure and lesion. *Neuroscience* **82**, 7-19.
 22. Snyder, S. E., Peng, B., Pintar, J. E., and Salton, S. R. (2003) Expression of VGF mRNA in developing neuroendocrine and endocrine tissues. *The Journal of endocrinology* **179**, 227-235.
 23. Brancia, C., Noli, B., Boido, M., Boi, A., Puddu, R., Borghero, G., Marrosu, F., Bongioanni, P., Orru, S., Manconi, B., D'Amato, F., Messana, I., Vincenzoni, F., Vercelli, A., Ferri, G. L., and Cocco, C. (2016) VGF Protein and Its C-Terminal Derived Peptides in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Human and Animal Model Studies. *PloS one* **11**, e0164689.
 24. Busse, S., Bernstein, H. G., Busse, M., Bielau, H., Brisch, R., Mawrin, C., Muller, S., Sarnyai, Z., Gos, T., Bogerts, B., and Steiner, J. (2012) Reduced density of hypothalamic VGF-immunoreactive neurons in schizophrenia: a potential link to impaired growth factor signaling and energy homeostasis. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **262**, 365-374.
 25. Thakker-Varia, S., Krol, J. J., Nettleton, J., Bilimoria, P. M., Bangasser, D. A., Shors, T. J., Black, I. B., and Alder, J. (2007) The neuropeptide VGF produces antidepressant-like behavioral effects and enhances proliferation in the hippocampus. *J Neurosci* **27**, 12156-12167.
 26. Zhao, Z., Lange, D. J., Ho, L., Bonini, S., Shao, B., Salton, S. R., Thomas, S., and Pasinetti, G. M. (2008) Vgf is a novel biomarker associated with muscle weakness in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), with a potential role in disease pathogenesis. *International journal of medical sciences* **5**, 92-99.
 27. Shimazawa, M., Tanaka, H., Ito, Y., Morimoto, N., Tsuruma, K., Kadokura, M.,

- Tamura, S., Inoue, T., Yamada, M., Takahashi, H., Warita, H., Aoki, M., and Hara, H. (2010) An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PloS one* **5**, e15307.
28. Jiang, C., Lin, W. J., and Salton, S. R. (2018) Role of a VGF/BDNF/TrkB Autoregulatory Feedback Loop in Rapid-Acting Antidepressant Efficacy. *J Mol Neurosci.*
 29. Baig, S. S., Strong, M., and Quarrell, O. W. (2016) The global prevalence of Huntington's disease: a systematic review and discussion. *Neurodegener Dis Manag* **6**, 331-343.
 30. Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., and Tabrizi, S. J. (2015) Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15005.
 31. Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., and Young, A. B. (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 5733-5737.
 32. Duennwald, M. L., and Lindquist, S. (2008) Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes & development* **22**, 3308-3319.
 33. Rahman, S., Archana, A., Jan, A. T., and Minakshi, R. (2018) Dissecting Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response (UPR(ER)) in Managing Clandestine Modus Operandi of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **10**, 30.
 34. Cabral-Miranda, F., and Hetz, C. (2018) ER Stress and Neurodegenerative Disease: A Cause or Effect Relationship? *Curr Top Microbiol Immunol* **414**, 131-157.
 35. Kaus, A., and Sareen, D. (2015) ALS Patient Stem Cells for Unveiling Disease Signatures of Motoneuron Susceptibility: Perspectives on the Deadly Mitochondria, ER Stress and Calcium Triad. *Front Cell Neurosci* **9**, 448.
 36. Jiang, Y., Chadwick, S. R., and Lajoie, P. (2016) Endoplasmic reticulum stress:

- The cause and solution to Huntington's disease? *Brain research* **1648**, 650-657.
37. Annoura, H., Nakanishi, K., Toba, T., Takemoto, N., Imajo, S., Miyajima, A., Tamura-Horikawa, Y., and Tamura, S. (2000) Discovery of (2S)-1-(4-amino-2,3,5- trimethylphenoxy)-3-[4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl]-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075): a dual Na(+) and Ca(2+) channel blocker with antioxidant activity. *Journal of medicinal chemistry* **43**, 3372-3376.
 38. Kotani, Y., Morimoto, N., Oida, Y., Tamura, Y., Tamura, S., Inoue, T., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2007) Prevention of in vitro and in vivo acute ischemic neuronal damage by (2S)-1-(4-amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-{4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl}-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075), a novel neuroprotective agent with antioxidant properties. *Neuroscience* **149**, 779-788.
 39. Oyagi, A., Oida, Y., Hara, H., Izuta, H., Shimazawa, M., Matsunaga, N., Adachi, T., and Hara, H. (2008) Protective effects of SUN N8075, a novel agent with antioxidant properties, in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Brain research* **1214**, 169-176.
 40. Akane, M., Shimazawa, M., Inokuchi, Y., Tsuruma, K., and Hara, H. (2011) SUN N8075, a novel radical scavenger, protects against retinal cell death in mice. *Neuroscience letters* **488**, 87-91.
 41. Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S. W., and Bates, G. P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506.
 42. Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., and Beal, M. F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of neurology* **41**, 646-653.
 43. Reijonen, S., Putkonen, N., Norremolle, A., Lindholm, D., and Korhonen, L. (2008) Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins.

Experimental cell research **314**, 950-960.

44. Monteggia, L. M., Barrot, M., Powell, C. M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R. W., and Nestler, E. J. (2004) Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10827-10832.
45. Salton, S. R., Ferri, G. L., Hahm, S., Snyder, S. E., Wilson, A. J., Possenti, R., and Levi, A. (2000) VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology* **21**, 199-219.
46. Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., Friedlander, R. M., Silani, V., Hayden, M. R., Timmusk, T., Sipione, S., and Cattaneo, E. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y)* **293**, 493-498.
47. Lievens, J. C., Woodman, B., Mahal, A., and Bates, G. P. (2002) Abnormal phosphorylation of synapsin I predicts a neuronal transmission impairment in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Molecular and cellular neurosciences* **20**, 638-648.
48. Obrietan, K., and Hoyt, K. R. (2004) CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci* **24**, 791-796.
49. Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L. A., Hersch, S. M., Hobbs, W., Vonsattel, J. P., Cha, J. H., and Friedlander, R. M. (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature medicine* **6**, 797-801.
50. Dedeoglu, A., Kubilus, J. K., Jeitner, T. M., Matson, S. A., Bogdanov, M., Kowall, N. W., Matson, W. R., Cooper, A. J., Ratan, R. R., Beal, M. F., Hersch, S. M., and Ferrante, R. J. (2002) Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* **22**, 8942-8950.
51. Schiefer, J., Landwehrmeyer, G. B., Luesse, H. G., Sprunken, A., Puls, C., Milkereit, A., Milkereit, E., and Kosinski, C. M. (2002) Riluzole prolongs

- survival time and alters nuclear inclusion formation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mov Disord* **17**, 748-757.
52. Vande Velde, C., Dion, P. A., and Rouleau, G. A. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis: new genes, new models, and new mechanisms. *F1000 biology reports* **3**, 18.
 53. Ishigaki, S., Niwa, J., Yamada, S., Takahashi, M., Ito, T., Sone, J., Doyu, M., Urano, F., and Sobue, G. (2007) Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiology of disease* **25**, 331-341.
 54. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
 55. Aoki, M., Ogasawara, M., Matsubara, Y., Narisawa, K., Nakamura, S., Itoyama, Y., and Abe, K. (1994) Familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Japan associated with H46R mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene: a possible new subtype of familial ALS. *Journal of the neurological sciences* **126**, 77-83.
 56. Pan, L., Yoshii, Y., Otomo, A., Ogawa, H., Iwasaki, Y., Shang, H. F., and Hadano, S. (2012) Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1G93A and SOD1H46R, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PloS one* **7**, e33409.
 57. Abe, K., Itoyama, Y., Sobue, G., Tsuji, S., Aoki, M., Doyu, M., Hamada, C., Kondo, K., Yoneoka, T., Akimoto, M., and Yoshino, H. (2014) Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* **15**, 610-617.
 58. Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* **330**, 585-591.
 59. Cheah, B. C., Vucic, S., Krishnan, A. V., and Kiernan, M. C. (2010) Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Current medicinal chemistry*

- 17, 1942-1199.
60. Ito, H., Wate, R., Zhang, J., Ohnishi, S., Kaneko, S., Ito, H., Nakano, S., and Kusaka, H. (2008) Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Experimental neurology* **213**, 448-455.
 61. Yoshino, H., and Kimura, A. (2006) Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph Lateral Scler* **7**, 241-245.
 62. Tanaka, H., Shimazawa, M., Kimura, M., Takata, M., Tsuruma, K., Yamada, M., Takahashi, H., Hozumi, I., Niwa, J., Iguchi, Y., Nikawa, T., Sobue, G., Inuzuka, T., and Hara, H. (2012) The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* **2**, 573.
 63. Riedl, M. S., Braun, P. D., Kitto, K. F., Roiko, S. A., Anderson, L. B., Honda, C. N., Fairbanks, C. A., and Vulchanova, L. (2009) Proteomic analysis uncovers novel actions of the neurosecretory protein VGF in nociceptive processing. *J Neurosci* **29**, 13377-13388.
 64. Molteni, L., Rizzi, L., Bresciani, E., Possenti, R., Petrocchi Passeri, P., Ghe, C., Muccioli, G., Fehrentz, J. A., Verdie, P., Martinez, J., Omeljaniuk, R. J., Biagini, G., Binda, A., Rivolta, I., Locatelli, V., and Torsello, A. (2017) Pharmacological and Biochemical Characterization of TLQP-21 Activation of a Binding Site on CHO Cells. *Front Pharmacol* **8**, 167.
 65. Wilbourn, A. J. (1998) Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Lambert and the El Escorial criteria. *Journal of the neurological sciences* **160 Suppl 1**, S25-29.
 66. Moss, A., Ingram, R., Koch, S., Theodorou, A., Low, L., Baccei, M., Hathway, G. J., Costigan, M., Salton, S. R., and Fitzgerald, M. (2008) Origins, actions and dynamic expression patterns of the neuropeptide VGF in rat peripheral and central sensory neurones following peripheral nerve injury. *Molecular pain* **4**, 62.
 67. Bartolomucci, A., Pasinetti, G. M., and Salton, S. R. (2010) Granins as disease-biomarkers: translational potential for psychiatric and neurological

- disorders. *Neuroscience* **170**, 289-297.
68. Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S. K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y. P., and Salton, S. R. (2011) The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* **32**, 755-797.

略語一覽表

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
CgB	Chromogranin B
CSF	Cerebrospinal fluid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ERAD	Endoplasmic stress-associated degradation
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mHtt	Mutant Huntingtin
MKP1	Mitogen activated protein kinase phosphatase 1
MSNs	Medium spiny neurons
NERP	Neuroendocrine regulatory peptide
NGF	Nerve growth factor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NPY	Neuropeptide Y
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Prohormone convertases
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RIPA	Radio immunoprecipitation assay
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxide dismutase
VGF	VGF nerve growth factor inducible